

Untersuchung von zytotoxischen und DNA-schädigenden
Effekten durch Zementstäube auf kultivierte humane
Lungenzellen: WST-1 Assay und COMET-Assay

NATALIA NOAK

INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Untersuchung von zytotoxischen und DNA-schädigenden
Effekten durch Zementstäube auf kultivierte humane
Lungenzellen: WST-1 Assay und COMET-Assay**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Noak Natalia, geb. Morozova
aus Birobidzan

Gießen 2011

Aus dem Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. V. Mersch-Sundermann

Betreuer: Dr. rer. nat. Richard Gminski

Gutachter: Prof. Dr. V. Mersch-Sundermann

Gutachter: Prof. Dr. A. Günther

Tag der Disputation: 19.11.12

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis.....	6
Definitionen.....	8
1. Einleitung und Fragestellung.....	10
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Materialien.....	17
2.1.1 Material für die Zellenanzüchtung.....	19
2.1.2 Reagenzien- und Medienherstellung für die Zellkultivierung.....	19
2.1.3 Untersuchten Zemente.....	20
2.1.4 Materialien und Reagenzien für die Herstellung der Zementsstaubsuspensionen.....	22
2.1.5 Materialien und Reagenzien für den WST-1-Zytotoxizitäts-Assay.....	23
2.1.6 Reagenzien und Kulturmedien für Comet-Assay.....	24
2.1.7 Materialien für den Comet-Assay.....	25
2.1.8 Geräte.....	26
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Grundsätzliche Arbeitsvorschriften.....	27
2.2.2 Humane Lungenkarzinomzelllinie (A549).....	28
2.2.3 Kultivierung der A 549-Zellen.....	29
2.2.4 Zellzahlbestimmung.....	29
2.2.5 Probenvorbereitung (Suspendierung) der Zementstäube.....	31
2.2.6 WST-1.....	32
2.2.7 Comet-Assay.....	35
2.2.8 Statistik.....	43
3. Ergebnisse.....	44
3.1 Chemische und physikalische Charakterisierung der untersuchten Zementstäube.....	44
3.2 Toxikologische Untersuchungen der Zementstäube.....	46
3.2.1 Zytotoxische Wirkung.....	46

3.2.2 Genotoxische Wirkung.....	50
3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse (WST-1 und Comet Assay) in A549- Zellen.....	58
 4. Diskussion.....	 59
4.1 Zusammenhang zwischen der Zementpartikelgröße und Toxizität der Zementstäube.....	60
4.2 Einfluss der chemischen Zusammensetzung auf die Toxizität der Zementstäube.....	61
4.3 Zusammenhänge zwischen den geprüften Konzentrationen und toxischen Eigenschaften der Zementstäube.....	62
4.4 Alkalität.....	63
 5. Zusammenfassung.....	 64
 6. Summary.....	 66
 7. Literaturverzeichnis.....	 67
 8. Danksagung.....	 74
 9. Lebenslauf.....	 75

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	Chronisch-Obstruktive Lungenerkrankung
d.h.	Das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleidacid, Desoxyribonukleinsäure
DQ 12	Dörentruper Quarz 12
et al.	Et alii, und andere
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
ggf.	Gegebenenfalls
gr.	griechisch
h	Hora, Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
KCL	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
lat.	lateinisch
M	Molar
M.-%	Massenprozent
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
-OH	Hydroxylradikal
OR	Odd ratio, Chancenverhältnis
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
ppm	Parts per million
Pen./Strep.	Penicillin/Streptomycin
PM	Particulate Matter-englische Bezeichnung für Feinstaub (wird gemessen in µm)

rel. Luftf.	Relative Luftfeuchtigkeit
rpm	Umdrehungen pro Minute
TiO ₂	Titandioxid
Tab.	Tabelle
u.a.	Unter anderem
VK	Vitalkapazität
vs.	Versus, gegen
z.T.	zum Teil
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µmol	Mikromolar

Definitionen

Blindwert

Hintergrundkonzentrationen des Prüfsystems (Emissionsprüfkammer und Analysengerät) für einzelne Substanzen (VOC) sowie TVOC.

Gentoxizität

Gentoxizität ist die reversible oder irreversible Schädigung des Erbguts (DNS) durch chemische Substanzen oder aufgrund physikalischer Einflüsse. Die hervorgerufenen Veränderungen an der DNS können dabei mutagen (dauerhaft vererbbar), kanzerogen (krebsauslösend) oder teratogen (fruchtschädigend) ausfallen.

In vitro

Als *in vitro* (lat. im Glas) bezeichnet man organische Vorgänge, die außerhalb eines lebenden Organismus stattfinden. In der Naturwissenschaft bezieht sich *in vitro* auf Experimente, die in einer kontrollierten künstlichen Umgebung außerhalb eines lebenden Organismus durchgeführt werden.

In vivo

Als *in vivo* (lat. im Lebendigen) bezeichnet man in der Wissenschaft Prozesse, die im lebendigen Organismus ablaufen.

Phagozytose

(gr. phagein = fressen) ist die Aufnahme von Nahrungspartikeln bis hin zu kleineren Zellen von einer einzelnen eukaryotischen Zelle.

Pinozytose

(„Zelltrinken“) ist die Aufnahme von kleineren Flüssigkeitsmengen und darin gelösten Substanzen aus dem Umgebungsmedium einer Zelle in ihr Inneres.

Viabilität

Unter Zellvitalität (Zelllebensfähigkeit) versteht man die Gesamtaktivität einer Zellpopulation.

Zytotoxizität

Als Zytotoxizität wird die Fähigkeit von chemischen Substanzen bezeichnet, Zellen zu schädigen oder zu töten.

1. Einleitung und Fragestellung

Heutzutage rückt das Thema Staubbelastung immer mehr in den Vordergrund. Als Staub oder englisch "Particulate Matter" (PM) bezeichnet man Teilchen in der Luft, die nicht sofort zu Boden sinken, sondern in der Atmosphäre sind. Von der Herkunft wird unterschieden ob der Staub einen natürlichen Ursprung hat (z.B. Staub aus der Wüste oder durch den Waldbrand) oder durch das menschliche Handeln erzeugt wird (z.B. Staub aus den Abfallverbrennungsanlagen, dem Schüttgutumschlag oder der Bauindustrie) (www.umweltbundesamt.de/luft/schadstoffe/feinstaub).

Beim Staub wird es zwischen den verschiedenen Partikelgrößen und dem jeweiligen Abscheideverhalten im menschlichen Atemtrakt unterschieden. Staub setzt sich aus mikroskopisch kleinen Teilen zusammen, die über das respiratorische System in den Organismus aufgenommen werden können. Die Staubpartikel sind eine komplexe Mischung aus festen und / oder flüssigen in die Luft ausgestoßenen organischen und anorganischen Schadstoffen (Becker J. et al., 2005).

Je nach Partikelgröße wird der Staub folgendermaßen unterteilt:

- **Ultrafeine Partikel (UP)** sind Partikel, die einen Durchmesser von 0,001 bis 0,1 μm aufweisen. Diese haben im Feinstaub einen Anteil von 80 - 90 Prozent an der Anzahlkonzentration. Der Anteil an der Massenkonzentration liegt jedoch in der Regel unter 5 Prozent. Ultrafeine Partikel sind alveolengängig und werden zu mehr als 50 Prozent in der Lunge abgeschieden.
- **Feinere und feinste Partikel** sind Partikel, die einen aerodynamischen Durchmesser unter 2,5 μm aufweisen. Sie sind der lungengängige Feinstaub. PM 2,5 Partikel sind solche, die einen größenselektierenden Lufteinlass passieren. Sie sind alveolengängig und werden daher auch als „alveolengängiger Feinstaub“ bezeichnet. Er wird zu 50 Prozent in der Lunge abgeschieden.
- **Grobkörnigere Partikel** sind Partikel, die einen Durchmesser unter 10 μm aufweisen und zum inhalierbaren Feinstaub gehören. PM 10 Partikel können bis in die oberen Atemwege und zur Lunge gelangen.
- **Grobstaub** hat eine Partikelgröße von 10 μm bis maximal 50 μm . Partikel mit dem größeren Durchmesser können nur noch sehr kurz oder gar nicht in der Schwebe gehalten werden. Die Grobstaubklasse wird auch als Total Suspended Particulates (TSP) oder Gesamtstaub bezeichnet (Obenland H., Kerber T., 2005).

Da die Lungen ständig im Kontakt mit der Außenluft sind, sind sie auch den Stäuben aus der Außenluft ausgesetzt. Dank verschiedenen Schutzmechanismen, über welche die gesunden Lungen verfügen, werden die meisten Partikel aus dem respiratorischen System entfernt. Die größeren Staubpartikel werden bereits in der Nase abgefangen und mit dem Schleim entfernt. Die feineren Partikel werden mit Hilfe vom Flimmerepithel in die Hauptbronchien transportiert und von da abgehustet. Die kleinsten Partikel, die auch bis zu den Alveolen gelangen können, werden vom lungeneigenen Abwehrsystem abgefangen und eliminiert. (Abb. 1)

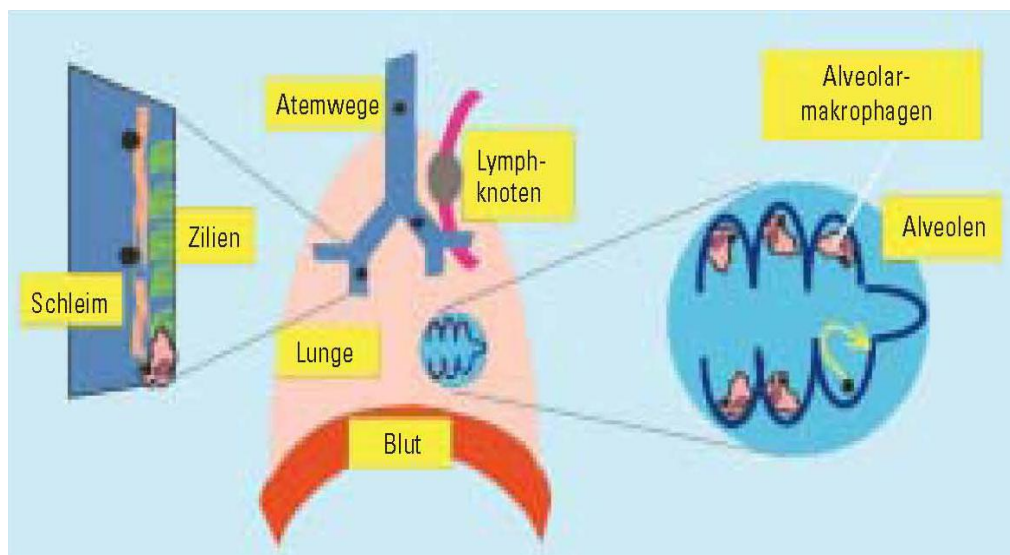


Abb. 1 Mechanismen der Partikelreinigung: In den Atemwegen sorgt die Zilienbewegung für den Transport der Partikel zum Kehlkopf; in den Alveolen werden sie von Makrophagen aufgenommen und transportiert. Quelle: Beckers J. et al., 2005; Bild von Kreyling W., S.26.

Allerdings, wenn die Staubexposition zu groß ist oder über längere Zeit stattfindet, kann auch passieren, dass die Abwehr- und Reinigungsmechanismen überfordert werden und nicht alle Partikel entfernt werden können. Die übrig gebliebenen Partikel können von den Alveolarepithelzellen endozytiert werden, was zu Entzündungsreaktionen führen kann.

Zahlreiche Studien zeigen, dass Menschen, die beruflich mit viel Staub zu tun haben (z.B. Bauarbeiter oder Bergarbeiter), häufiger Lungenkrebs oder andere respiratorische Erkrankungen haben als diejenigen, die keinen Staub beruflich ausgesetzt sind. (Cortez & Peixoro, 1978; Maciejewska & Bielichowska-Cybula 1991; Becher & Dietz et al., 2002)

Für den menschlichen Organismus sind vor allem ultrafeine Partikel gefährlich. (Abb. 2)

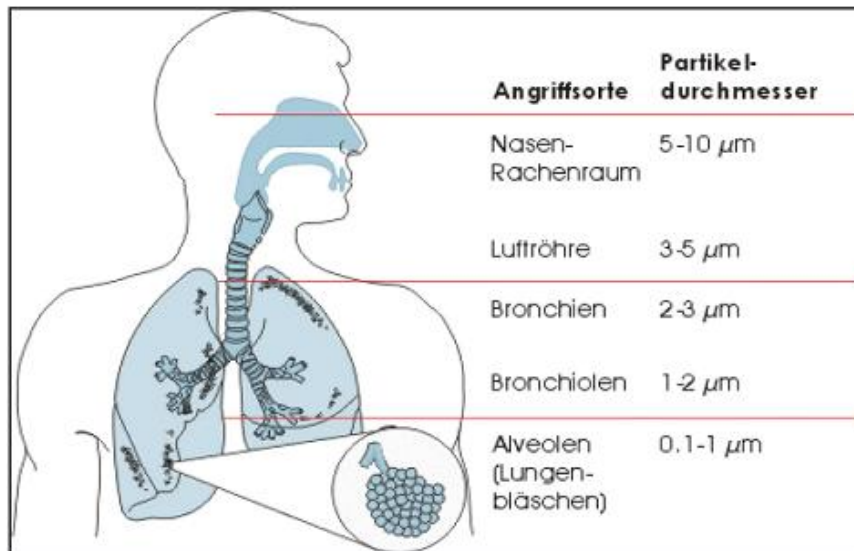


Abb. 2 Abscheideverhalten im menschlichen Atemtrakt. Quelle: Gesundheits- und Umweltdepartement (UGZ) (www.lubw.baden-wuerttemberg.de).

Da sie sehr klein sind, können sie problemlos die meisten Reinigungsmechanismen der Lunge umgehen und ganz tief (bis zu den Alveolen) in den respiratorischen Trakt gelangen.

Die klitzekleinen Staubpartikel werden von den Abwehrzellen des Immunsystems nicht erkannt und können möglicherweise in den feinsten Verästelungen der Lunge entzündliche Reaktionen auslösen bzw. von dort aus direkt in die Lymph- und Blutbahnen gelangen.

Aber nicht nur die Partikelgröße spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Lungenkrankheiten, sondern auch die Zusammensetzung der Staubpartikel. Besonders gefährlich sind Schadstoffe wie die giftigen Schwermetalle Blei, Cadmium, Quecksilber sowie die als Katalysator wirkenden Schwermetalloxide oder krebserzeugende polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe PAK, die dann direkt an den empfindlichen Lungenbläschen ihre Wirkung entfalten können. Durch die katalysatorische Wirkung einiger Metalloxide kann außerdem das gasförmige Schwefeldioxid in das noch schädlichere Schwefeltrioxid umgewandelt werden, das seinerseits zusammen mit der Feuchtigkeit in den Lungenbläschen Schwefelsäure bildet. Stäube können somit Bronchitis, Emphysem (Überblähung der Lungenbläschen) und Lungenentzündung verursachen sowie Lungenkrebs und Blutarmut bedingen (Abrons et al., 1988). Sie können ebenfalls allergen sein. Vor allem bei den Kindern können bereits die kleinsten Mengen von oben genannten Stoffen schwerwiegende Atemerkrankungen verursachen, die bis zum Atemnot und Tod führen können.

Ein sehr wichtiger Faktor ist auch der pH-Wert der Partikel z.B.: Zement ist stark alkalisch und wirkt daher ätzend (Fairhurst, 2005; Dietz et. al., 2004). Die durch Direktkontakt mit Zement hervorgerufenen Verätzungen sind langwierige Verletzungen, die vor allem deswegen problematisch sind, weil sie wegen des geringen Auslöseschmerzens von den Betroffenen oft nicht rechtzeitig wahrgenommen werden. Dabei kann in besonders schweren Fällen das Gewebe zu Grunde gehen. Die Symptome und die Schwere der Staublungen-Erkrankung sind abhängig von der Art, Menge, Größe und der fibroblastischen Reizwirkung der Staubpartikel, sowie von der Einwirkungsdauer. Staublunge kann sich zu einer entschädigungspflichtigen Berufskrankheit entwickeln.

Man vermutet, dass die Staubpartikel durch Phagozytose in Form von Vesikeln, Vakuolen oder membranumschlossenen Zellkompartimenten (Lamellarkörpern) in die Lungenzelle aufgenommen werden. Große Partikel werden meist von einer Membran umschlossen. Die Partikel, die kleiner als 30 nm sind, werden durch Pinozytose aufgenommen. Das passiert entweder rezeptorvermittelt oder unspezifisch.

Es wird angenommen, dass folgender Vorgang stattfindet: im Zellinneren wird ein Reiz ausgelöst, der die Zellmembran eine Einbuchtung bilden lässt. Hier wird der Partikel von Pseudopodien umgeben und anschließend entsteht ein primäres Phagosom. Der pH-Wert im primären Phagosom wird auf Werte zwischen 4,6 und 6,1 abgesenkt, bevor sich Lysosomen anlagern, die lytische Enzyme in das Phagosom freisetzen. Es entsteht ein sekundäres Phagosom, auch Phagolysosom genannt (Tjelle et al. 2000). Diese Form der Partikelaufnahme ist ein aktiver Prozess.

Möglich wäre hier aber auch, dass sich die Staubpartikel außerhalb der Zelle komplett in der Suspension auflösen, anschließend in die Zelle diffundieren, oder auch aktiv in die Zelle aufgenommen werden. Bisherige Studien haben gezeigt, dass Staubpartikel innerhalb einer Zelle verstreut vorkommen können.

Zu dem größten, durch die Menschheit verursachten, „Staubmacher“ gehört die Bauindustrie. Vor allem der Zement, der in der Baubranche unentbehrlich ist, ist eine sehr beachtliche Staubquelle.

Die im Jahr 1998 durchgeführte Rhein-Neckar-Studie zur Epidemiologie vom Larynxkarzinom hat gezeigt, dass das Risiko, ein Karzinom des respiratorischen Traktes zu bekommen, bei den Bauarbeitern erhöht ist. Vor allem bei den Probanden, die bei der Arbeit dem Zementstaub ausgesetzt waren.

Zement ist ein anorganischer, nichtmetallischer, feingemahlener Stoff, der nach dem Anrühren mit Wasser infolge chemischer Reaktionen mit dem Anmachwasser selbstständig erstarrt und erhärtet. Er bleibt nach dem Erhärten auch unter Wasser fest

und raumbeständig. Chemisch betrachtet ist Zement hauptsächlich kieselbares Calcium mit Anteilen an Aluminium und Eisen, das als kompliziertes Stoffgemisch vorliegt. Im Allgemeinen enthält er auch Anteile an Sulfaten.

Außer den oben genannten Stoffen, können die Zemente bis zu 5 % Nebenbestandteile bzw. Zementzusätze enthalten. Je nach Bestandteil können die Zementzusätze physikalische Eigenschaften vom Zement beeinflussen.

Alle Zementarten werden in „Normalzemente“ und „Sonderzemente“ (Zemente mit zusätzlichen oder besonderen Eigenschaften) unterteilt.

Die europäische Norm für Normalzemente (DIN EN 197-1) umfasst alle in Europa hergestellten Zemente, die sich in den EU-Mitgliedsstaaten unter den unterschiedlichen Klima- und Anwendungsbedingungen unter dem Gesichtspunkt der Dauerhaftigkeit bewährt haben. Die 27 Normalzemente nach DIN EN 197-1 werden in die fünf Hauptzementarten, mit jeweils verschiedenen Untergruppen, unterteilt (VDZ, Deutsche Zementindustrie, www.vdz-online.de). (Tab.1)

Die Kurzbezeichnung der Zementarten ist europaweit nach folgender Festlegung gewählt

- **K** für Portlandzementklinker
- **S** für Hüttensand (granulated blast furnace slag)
- **P** für natürliches Puzzolan (z. B. Trass)
- **Q** für natürliches getempertes Puzzolan
- **T** für gebrannten (Öl)-Schiefer (burntshale)
- **V** für kieselssäurereiche Flugasche (cendre volante)
- **W** für kalkreiche Flugasche
- **L** für Kalkstein (Limestone)
- **D** für Silicastaub
- **M** für Portlandkompositzemente mit mehr als zwei Hauptbestandteile

Hauptzementarten	Bezeichnung 27 Produkte (Normalzementarten)	
CEM I	Portlandzement	CEM I
CEM II	Portlandhüttenzement	CEM II/A-S
		CEM II/B-S
	Portlandsilicastaubzement	CEM II/A-D
	Portlandpuzzolanzement	CEM II/A-P
		CEM II/B-P
		CEM II/A-Q
		CEM II/B-Q
	Portlandflugaschezement	CEM II/A-V
		CEM II/B-V
		CEM II/A-W
		CEM II/B-W
	Portlandschieferzement	CEM II/A-T
		CEM II/B-T
	Portlandkalksteinzement	CEM II/A-L
		CEM II/B-L
		CEM II/A-LL
		CEM II/B-LL
	Portlandkompositzement	CEM II/A-M
		CEM II/B-M
CEM III	Hochofenzement	CEM III/A
		CEM III/B
		CEM III/C
CEM IV	Puzzolanzement	CEM IV/A
		CEM IV/B
CEM V	Kompositzement	CEM V/A
		CEM V/B

Tab. 1 Normalzemente und ihre Zusammensetzung nach DIN EN 197-1. Quelle: Verein Deutscher Zementwerke e.V. (VDZ, Düsseldorf; www.vdz-online.de).

Die Zemente, die in dieser Arbeit getestet wurden, gehören zu den Normalzementen. Jeder von diesen Zementen war mit den Buchstaben G, K, L, J und H1 verschlüsselt. Die Zusammensetzung der Zemente wurde erst nach dem Forschungsende zur Verfügung gestellt. Daher war die Einteilung in die verschiedenen Gruppen auch erst nach dem Versuchsende möglich.

Auf Grund der Zusammensetzung, Partikelgröße und Alkalität der Zementstäube ist es anzunehmen, dass er reizend oder sogar krebserregend auf die Atemwege wirken kann. Außerdem hat man festgestellt, dass in Branchen mit der hohen Zementexposition, wie z.B. Baugewerbe, die Kehlkopfkarzinome bei den Arbeitern im Vergleich zur restlichen Bevölkerung häufiger auftreten. (Dietz et al., 2004)

Zur Abklärung der toxischen, inflammatorischen, gentoxischen und karzinogenen Risiken von Zementstäuben besteht Forschungsbedarf.

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf verschiedene Zementstäube, die im europäischen Baugewerbe ihre Anwendung finden, auf mögliche zytotoxische und gentoxische Wirkung (DNA-schädigende Effekte) untersucht. Da der Atemtrakt im Vergleich zu den anderen Organen vermutlich am meisten von der Zementstaub-Exposition betroffen ist, wurde eine in vitro-Modell auf Basis der menschlichen Lungenzellen der Zelllinie A549 eingesetzt (als Modell für humanen Typ II Alveolar-Epithelzellen). Für die Untersuchungen der Zytotoxizität wurde der WST-1-Test eingesetzt: er misst die metabolische Zellaktivität und stellt eine wasserlösliche Variante des bisher bekannten MTT-Tests dar. Als biologischer Endpunkt diente in den Studien zur Gentoxizität die Induktion von der DNA-Migration als Zeichen einer Induktion von DNA-Brüchen und alkalisch-sensitiven Stellen in der Einzelzellgelelektrophorese (SCGE: Single Cell Gel Electrophoresis; Comet-Assay, Rojas et al. 1999). Für die Validierung der angewandten Testsysteme wurden verschiedene Substanzen als negative und positive Kontrollen eingesetzt: Titandioxid (TiO_2) als negative Kontrolle, Feinquarz DQ12 (Dörentruper Quarz) als positive Kontrolle sowie Wasserstoffsuperoxid (H_2O_2).

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Chemikalien	Hersteller
0,5% Low Melting Point Agarose	Serva, Heidelberg
0,7% Normal Melting Point Agarose	Merck, Darmstadt
1% Normal Melting Point Agarose	Serva, Heidelberg
Aceton	Merck, Darmstadt
Benzo(a)pyren	Sigma-Aldrich, München
Bovine Pituitary Extract Protein Conc. 12,4 mg/mL	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
4,6-Diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem, Darmstadt
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, low glucose)	PAA, Pasching
Dörentruper Quarz	IUFZ, Düsseldorf
Dulbeccos PBS (1×)	PAA, Pasching
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	Roth, Karlsruhe
EGF Human Recombinant Protein Conc. 0,43 µg/µl	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Erythrosin B	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Riedel-de Haën, Seelze
1% Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Fötales Kälber Serum (FKS)	PAA, Pasching
37% HCL (Salzsäure) rauchend	Merck, Darmstadt
Hepes	Sigma-Aldrich, München
Keratinocyte-SFM Medium (Kit)	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Supplements For Keratinocyte – SFM	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe

Titandioxid (Anatase)	IUFZ, Düsseldorf
Tris Puffer	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	PAA, Pasching
Wasserstoffperoxid 30 % (H ₂ O ₂ , Perhydrol)	Merck, Darmstadt
Zement G, K, L, J und H1	VDZ (Verein Deutsche Zementwerke)

Besondere Geräte und Materialien	Hersteller
Bildanalysesystem	BFi OPTiLAS, Dietzenbach
Comet Analysesoftware 3.1	Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, GB
Elektronikrührer	Thermo Fisher Scientific
Electrophoresis Power Supply	Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophoresekommer	Biostep, Jahnsdorf
Falcon Tube 10 und 50 mL	Greiner Bio One, Frickenhausen
Elektronische Analysewaage AS60	OHAUS, Pine Brook, USA
Fluoreszenzmikroskop DMLS	Leica, Solms
Heizofen	Memmert, Schwabach
Inkubator	WTC Binder, Tuttlingen
Laser Partikelanalysator	Cilas US corp., Wisconsin, USA
Laminar Flow Bench	Kendro Laboratory Products
Lichtmikroskop	Leica, Solms
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Objektträger, ganz mattiert	Langenbrinck, Emmendingen
pH-Meter	inoLab (WTW), Weilheim
Quecksilber-UV Lampe, 254 nm, 50W/AC	Osram, München
Standröhrchen	Greiner Bio One, Frickenhausen
Transwells	Greiner Bio One, Frickenhausen
Ultraschall-Kompaktgerät	Roth, Karlsruhe
Vakuum-Saugpumpe	HLC, Bovenden
Vortexer	IKA, Staufen
Waage	SCALTEC, Göttingen

Wasserbad	Medingen, Grünberg
Zellkultur(Gewebe-)Schale, 12 Vertiefungen	Falkon, Wien
Zentrifuge Universal 5804 R	Eppendorf, Hamburg

2.1.1 Material für die Zellenanzüchtung

Material	Hersteller
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, low glucose)	PAA, Pasching
FCS Gold	PAA, Pasching
Streptomycin / Penicillin (P/S)	PAA, Pasching
Streptomycin / Penicillin (P/S)	Roth, Karlsruhe
Filter, BottleTop 250 mL, 045 mm 0,22 µm	Millipore, Schwallbach
Laborflasche, Schott, 500 mL	Fisherbrand, Schwerte
PBS (Phosphate-Buffered Saline, Phosphat gepufferte Salzlosung) Dulbecco o. Ca^{+} , Mg^{2+}	Boehring Mannheim
Trypsin, 10x	PAA, Pasching
Zellkulturflasche, schräg, 250 mL, 75 cm ² , Filterkappe	Greiner Bio One, Frickenhausen
sterile Pipettenspitzen	Fisherbrand, Schwerte

2.1.2 Reagenzien- und Medienherstellung für die Zellkultivierung

1. 500 mL Kulturmedium:

- 435 mL DMEM
- + 50 mL FCS (10%)
- + 10 mL 1 M Hepes
- + 5 mL (1%) P/S

Kulturmedium wurde mittels Bottle Top Filter und einer sterilen 500 mL Schott Flasche angesetzt. Es wurde zuerst P/S, Hepes und dann FCS pipettiert. Dann bis auf 500 mL mit DMEM (Low Glucose mit L-Glutamin) aufgefüllt. Als nächstes filtriert, im Kühlschrank aufbewahrt und regelmäßig ersetzt (Kriterium: Farbumschlag als Zeichen einer PH Veränderung).

2. Trypsin:

100 mg EDTA in 500 mL PBS lösen, steril filtern

Für den Gebrauch:

1 mL Trypsin 10x

+ 49 mL Stocksolution

Die Lösung pipetiert man unter sterilen Bedingungen (unter der Bank). Vor Gebrauch wurde das Trypsin einige Minuten im 37°C - Wasserbad erwärmt.

3. Hepes, 1 M

119,16 g Hepes und 500 mL destilliertes Wasser werden pH auf 7,4 eingestellt, steril gefiltert, autoklaviert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Kulturmedium wurde mittels Bottle Top Filter und einer sterilen 500 mL Schott Flasche angesetzt. Es wurde zuerst P/S, Hepes und dann FCS pipettiert.

Dann bis auf 500 mL mit DMEM (Low Glucose mit L-Glutamin) aufgefüllt. Als nächstes filtriert, im Kühlschrank aufbewahrt und regelmäßig ersetzt (Kriterium: Farbumschlag als Zeichen einer pH Veränderung).

2.1.3 Untersuchte Zemente

Die in dieser Arbeit untersuchten Zemente (G, J, K, L, H1), TiO₂ und DQ12 wurden von dem Verein Deutscher Zementwerke e.V. (VDZ, Düsseldorf) auf die Partikelgröße und Zusammensetzung untersucht und in der unten dargestellten Tabelle zur entsprechenden Zementarten eingeteilt. (Tab.2)

Alle hier untersuchten Zementstäube enthalten Partikel, die durchschnittlich zwischen 1,0 und 2,0 µm groß sind und zu feinen Partikel gehören.

Verschlüsselung	Bezeichnung	Größe D ₅₀ (µm)	Spezifische Oberfläche (cm ² /cm ³)	SiO ₂ (% w/w)
A	CEM II/B-P	1,5-2,0	89659	29,01
B	CEM II/B-T	1,5-2,0	85940	20,12
C	CEM II/A-LL	1,5-2,0	79238	14,76
D	CEM II/A-S	1,5-2,0	95206	17,51
G	CEM II/B-P	1,5-2,0	86892	29,92
J	CEM III/B	1,5-2,0	62613	25,97
K	CEM II/A-LL	1,0-1,5	62684	11,36
L	CEM II/A-LL	1,5	68254	15,1
H1	CEM I	1,0-1,5	63688	16,26
Referenz				
TiO ₂	Degussa	0,2-0,5		-
DQ12-Quarz	IUF	1,0-2,0		>90
Kalksteinmehl	VDZ	1,0-1,5	58803	0,61
Messprobe				
-	Backstein			20,82

Tab. 2 Vom VDZ, Düsseldorf zur Verfügung gestellte Zementstäube und Referenzen mit den jeweiligen Verschlüsselungen.

Der Zement unter Buchstabe G ist ein Portlandpuzzolanzement. Die Portlandpuzzolanzemente sind in verschiedenen Mischungsverhältnissen, Anteil des Puzzolans, erhältlich. Puzzolane sind kieselensäurehaltige oder kieselensäure- und tonerdehaltige natürliche oder künstliche Stoffe. Sie besitzen keinerlei Bindevermögen, und bilden erst zusammen mit Wasser und Kalk zementartige Eigenschaften. Diese Verbindung ist dann wasserunlöslich. Es ist ein hervorragendes Bindemittel zur Herstellung von geschmeidigen und sehr widerstandsfähigen Mörteln im Innen- und Außenbereich. Durch seine spezielle Zusammensetzung wird er seit vielen Jahren bei der Verlegung von Naturwerksteinplatten bevorzugt eingesetzt.

Die Zemente mit den Buchstaben K und L gehören zu Portlandkalksteinzement. Es ist ein Normzement, der durch gemeinsames Vermahlen von Portlandzementklinker, Kalkstein und Gips hergestellt wird. Der Klinkergehalt darf 80 Massenprozent nicht unterschreiten. Auf Grund seines geringeren Wasserbedarf, ausgeprägten Wasserrückhaltevermögen, günstigen Verarbeitung, hohen Dichtigkeit wird dieser

besonders in den Bereichen eingesetzt, wo eine rasche Festigkeitsentwicklung erwünscht ist.

Zement J ist ein Hochoffenzement. Die Basis von diesem Zement ist Portlandzementklinker und besonders reaktive Hüttensand. Er ist bei der Herstellung von Betonen erforderlich, die einem starken chemischen Angriff durch Wasser, Boden oder Gase ausgesetzt sind.

Unter H1 ist ein Portlandzement verschlüsselt. Er wird durch Vermahlen von Portlandzementklinker und Gips hergestellt. Der Klinkergehalt des Zements darf 95 Massenprozent nicht unterschreiten. Seine Einsatzgebiete sind: Beton, Stahlbeton, Spannbeton, Putz- und Mauermörtel, Betonwaren. Er darf für Mörtel und Beton mit hohem Frostwiderstand sowie mit hohem Frost- und Tausalzwiderstand verwendet werden (VDZ, Deutsche Zementindustrie, www.vdz-online.de).

2.1.4 Materialien und Reagenzien für die Herstellung der Zementsstaubsuspensionen

Material	Hersteller
Alufolie, 16 µm, 45 cm	Dr. Oetker, Bielefeld
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, low glucose)	PAA, Pasching
Glasbehälter	Borosilikatglas, Herzogenrat
Heizofen	Memmert, Schwabach
sterile Pipettenspitzen	Fisherbrand, Schwerte
Röhrchen, Falcon, 50 mL	Greiner Bio One, Frickenhausen
Waage	SCALTEC, Göttingen
Vortexer	IKA, Staufen
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin Sonorex, Berlin

2.1.5 Materialien und Reagenzien für den WST-1-Zytotoxizität-Assay

Material	Hersteller
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche, Mannheim
Cellstar® Tissue Culture Plate	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cultex® Expositionsmodul	Vitrocell, Waldkirch
DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) ohne Phenolrot, 500 mL	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Falcon® Multiwell™ 6 Well	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
HERAsafe	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, München
Infinite® M 200	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Inkubator	WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen
Laborpumpe C10 P5	Haake, Karlsruhe
Mass Flow Controller	Analyt, Müllheim
Pipetus® Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Stripetten® 10 mL	CorningIncorporated, Corning, NY, USA
Stripetten® 5 mL	CorningIncorporated, Corning, NY, USA
ThinCert™ Well	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Vakuumpumpe Laboport	HLC, Bovenden
Wasserbad	Medingen, Grünberg

2.1.6 Reagenzien und Kulturmedien für Comet-Assay

1. Kulturmedium, Nährmedium, Trypsin siehe 2.1.2

2. Agarose:

1% Agarose	100 mg + 10 mL PBS Lösung
0,7% Agarose	70 mg + 10 mL PBS Lösung
0,5% Agarose	50 mg + PBS Lösung

Auf der Heizplatte zum Kochen bringen, mit Hilfe des Magnetrührers während des Kochens die ganze Zeit rühren. Für späteres Aufwärmen ins Wasserbad stellen.

3. PBS-Puffer:

von Boehringer Mannheim

4. Lyselösung:

146 g/L NaCl	2,5 mol/L (Merck 6400)
37,224 g/L EDTA-Triplex	0,1 mol/L (Merck 8418)
8,0 g/L NaOH	0,2 mol/L (Merck 6498)

In 1 Liter destilliertem Wasser lösen und einen pH von 10 einstellen.

Immer frisch dazu geben (am Tag des Versuches) auf 200 mL Lyselösung:

2 mL 1% TritonX-100 (Merck 1.12298)	langsam aufziehen, ist sehr zehflüssig
20 mL 10% DMSO	(Merck 802912)

5. Unwindig-Puffer:

0,3 mol/L NaOH	12 g/L NaOH
----------------	-------------

6. Elektrophoreselösung:

In 940 mL destilliertem Wasser folgende Substanzen lösen:

50 mL 0,8 mol/L NaOH	0,04 mol/L NaOH
10 mL 100 mM EDTA	1,0 mM EDTA-Triplex
17,53 NaCl	0,3 M NaCl

Auf pH 13 einstellen.

7. Tris-Lösung (zum Neutralisieren):

0,4 mol/L Tris 48,44 g/L in 1 L destilliertem Wasser lösen und dazu geben
25 mL HCl 37%
Auf pH 7,5 einstellen.

8. Ethidium-Bromidlösung (EB):

Vorhanden ist eine 1% Lösung EB, daraus wird eine Stammlösung 1:50 mit destilliertem Wasser hergestellt. 1 mL EB + 49 mL H₂O

Gebrauchslösung: Stammlösung mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnen.

9. Erythrosin-B Lösung:

20 mg Erythrosin-B in 50 mL PBS lösen.

10. Acridine-Orange Lösung (zum Färben von TiO₂):

0,03 g Acridine-Orange mit 200 mL Hank's Lösung verdünnen.

2.1.7 Materialien für den Comet-Assay

Material	Hersteller
Für den Testdurchführung	
Deckgläser, 24x60 mm	Menzel, Braunschweig
Erythrosin B	Merck, Darmstadt
Neubauer-Zählkammer	Lagerware
HBSS (Hank's balanced salt solution)	Merck, Darmstadt
Reaktionsgefäße mit Deckel 2 mL	Eppendorf, Hamburg
Titplex III (EDTA)	Merck, Darmstadt
Trypsin 2,5%	PAA, Pasching
Zellkultur(Gewebe-)Schale 12 Vertiefungen	Falcon, Wien
Für Objektträger-Zubereitung	
Aceton	Apotheke, Uniklinik Giessen
Agarose	Merck, Darmstadt

PBS, Dulbeccos w/o Ca, Mg	Boehringer Mannheim
Objektträger einseitig ganz mattiert	Fisherbrand, Schwerte
Ethidium-Bromid-Gebrauchslösung	
Aqua dest.	Apotheke, Uniklinik Giessen
Ethidium-Bromid 30 mL 1%	Merck, Darmstadt
Acridine-Orange-Gebrauchslösung	
Acridine-Orange	BIOTREND Chemikalien, Köln
HBSS (Hank's balanced salt solution)	Merck, Darmstadt
Tris-Puffer	
HCl 37% rauchend	Apotheke, Uniklinik Giessen
Tris	Merck, Darmstadt
LyseLösung und Lysegebrauchslösung	
DMSO	AppliChem, Darmstadt
NaOH-Plättchen	Merck, Darmstadt
NaCl reinst	Merck, Darmstadt
Triplex III (EDTA)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Elektrophoresepuffer	
NaOH-Plättchen	Merck, Darmstadt
Triplex III (EDTA)	Merck, Darmstadt

2.1.8 Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav H+P Varioklav Dampfsterilisator	Memmert GmbH & Co
Elektronische Analysenwaage AS60	OHAUS, Pine Brook, USA
Elektorrührer Monotherm	H+P Labortechnik, München
Elektrophoresekammer Supersub	Pharmacia Biotech, Wien
Färbekasten mit Schieferdeckel für 10 Objektträger 76 x 26 mm	Glaswerk Wertheim
Fluoreszenzmikroskop DMLS	Leica, Wetzlar
Handzähler H 20 Link	Voltkraft, Conrad Elektronik, Berlin

Inkubator	WTC Binder, Tuttlingen
Ionisationsmikroskop DMLS	Leica, Stuttgart
Lichtmikroskop	Leica, Stuttgart
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Pipettierer 0,5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL und 100-1000 µL	Eppendorf, Hamburg
Reagenzglasschüttler MSI Minishaker	IKA, Staufen
Sterile Werkbank Hera Safe	Heraeus, Hanau
Ultraschallgerät	Bandelin Sonorex
Vollpipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL und 50 mL	Kalensee Herbert, Giessen
Wasserbad Isotemp 215	Medingen, Grünberg
Zentrifuge Universal 5804 R	Eppendorf, Hamburg

2.2 Methoden

2.2.1 Grundsätzliche Arbeitsvorschriften

- Unter der Sterilbank verwendete Geräte zuvor mit 70-%igem Ethanol besprühen (Hände/Handschuhe, Pipettierhilfe, Absauger, Arbeitsfläche, Flaschen).
- Beim Absaugen von Medium oder Puffer direkten Kontakt zu den Zellen vermeiden.
- Komplettmedium und Trypsin auf 37°C im Wasserbad nicht zu lange temperieren (Pen/Strep enthaltendes Medium und Trypsin nicht länger als 15 min).
- Sterilbank nach der Arbeit gründlich und großflächig reinigen und alle nicht mehr benötigten Geräte abschalten. Behälter mit sterilen Pasteur-Pipetten wieder verschließen, volle Behälter leeren bzw. austauschen und aufgebrauchte Laborutensilien auffüllen.

2.2.2 Humane Lungenkarzinomzelllinie (A549)

Die Zelllinie A549 ist ursprünglich aus dem Bronchialkarzinomgewebe eines 58-jährigen Mannes kaukasischer Abstammung isoliert worden. Sie besitzt typische epitheliale Eigenschaften und synthetisiert, den Alveolarzellen Typ II ähnelnd, Lecithin (Giard et al., 1973; Lieber et al., 1976). (Abb.3)

Die A549-Zellen wurden von Wottrich (2003) mittels Durchflusszytometrie auf mögliche „Auto- Apoptose“ bzw. Nekrose nach konfluenter Langzeitkultur untersucht. Hier zeigte sich jedoch erst nach 4 Tagen ein schwacher Anstieg der Zahl apoptotischer und nekrotischer Zellen. Ihre Verdopplungszeit beträgt 24 Stunden.

Daher sind die A549-Zellen für die Untersuchungen bei dieser Arbeit uneingeschränkt verwendbar.

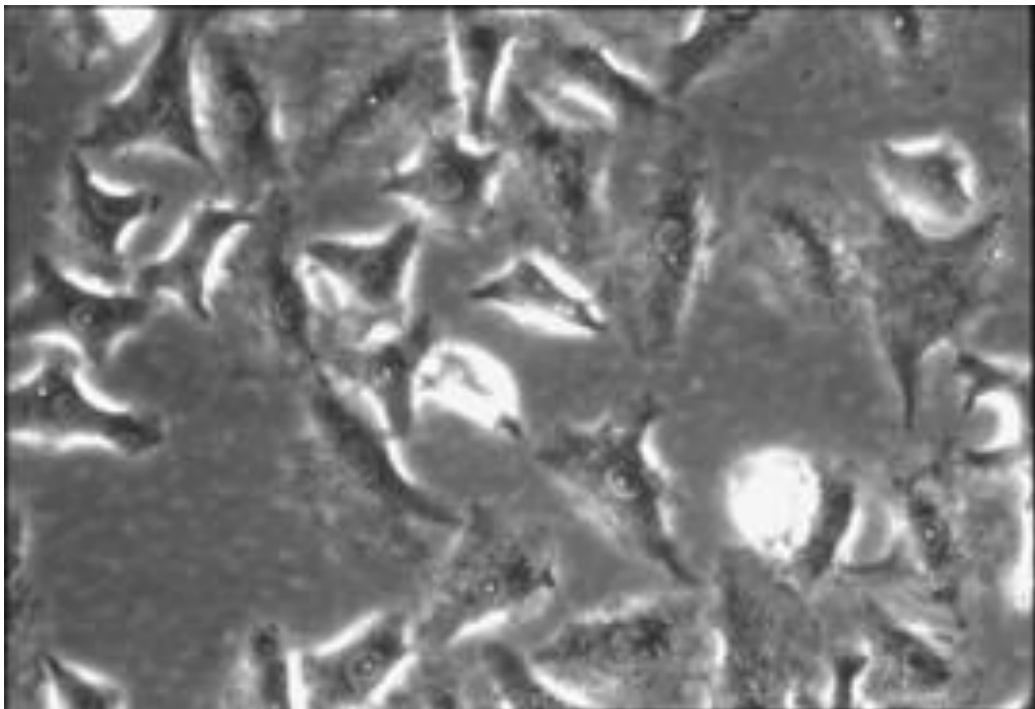


Abb. 3 Mikroskopisches Bild von Lungenkarzinomzellen A549 (Vergrößerung 400x).

2.2.3 Kultivierung der A549-Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (schräg, 250 mL, 75 cm², Filterkappe der Firma Greiner) bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Hier bildeten die Zellen einen Zellrasen (Monolayer). Als Nährmedium wurde 500 mL Kulturmedium verwendet (435 mL DMEM + 50 mL FCS (10%) + 10 mL 1 M Hepes + 5 mL (1%) Penicillin/Streptomycin). Das Medium wurde im Kühlschrank aufbewahrt und regelmäßig ersetzt (Kriterium: Farbumschlag als Zeichen einer PH-Veränderung). Bevor alle flüssigen Substanzen, wie Medium, Trypsin oder PBS, in Berührung mit den Zellen kommen, müssen sie im Wasserbad erwärmt werden.

Bei den Passagieren der Zellen wird zuerst vorsichtig das Medium aus der Flasche abgesaugt. Danach 2-mal mit jeweils 10 mL PBS-Lösung 2-4 mal spülen. Da die meisten Zellen auf den Flaschenboden festgewachsen sind, sollte man möglich vermeiden, den Boden der Zellkulturflasche mit dem Sauger zu berühren. Nach dem Waschen gibt man 5 mL Trypsin und stellt die Flasche für 5 min in den Brutschrank bei 37°C. Wenn die 5 Minuten vorbei sind, kontrolliert man mikroskopisch, ob die Zellen gelöst sind. Falls genug Zellen in der Flüssigkeit schwimmen, stoppt man die Trypsinierung mit 5 mL Vollmedium. Zellsuspension mit der Pipette aufnehmen und in einen vorbereiteten Falcon geben. Mit 10 mL Vollmedium nachspülen und Zellzahl bestimmen. Danach 2 mL Suspension mit der Pipette in eine sterile Kulturflasche geben und 18 mL Vollmedium nachfüllen. Die Flasche im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre inkubieren. Zellpassage 2 bis 3 mal die Woche durchführen.

2.2.4 Zellzahlbestimmung

Zur Zellerhaltung und hinsichtlich der reproduzierbaren Experimente müssen definierte Zellzahlen ausgestreut werden. Für die Bestimmung der Zellzahl sollte eine Zellsuspension mit gut vereinzelt Zellen vorliegen. Die Neubauer-Zählkammer (Abb. 4) besteht aus einer Glasplatte mit exakt definierter Vertiefung und einem, unter dem Mikroskop erkennbaren Zählgitter. Ein Deckglas wird auf die Zählkammer gelegt. 50 µL Aliquot der Zellsuspension wird mit 50 µL Erythrosin B-Lösung (1 mgmL⁻¹ / Stammlösung 10 mgmL⁻¹) verdünnt und an den Rand der Neubauer-Zählkammer gegeben, so dass die Zellen unter das Deckgläschen in die Zählkammer gesaugt werden. Da der Farbstoff nicht in die Zellen mit intakter Zellmembran eindringen kann, tote Zellen jedoch für die Erythrosin B-Lösung durchlässig sind, erscheinen diese unter

dem Mikroskop rot. Es werden nunmehr die Zellen von vier Quadranten ausgezählt. Die durchschnittliche Zellzahl je Quadrant wird mit dem Volumenfaktor der Zählkammer (10.000) multipliziert. Man erhält als Resultat die Zellzahl pro Milliliter (Lindl, 2000).

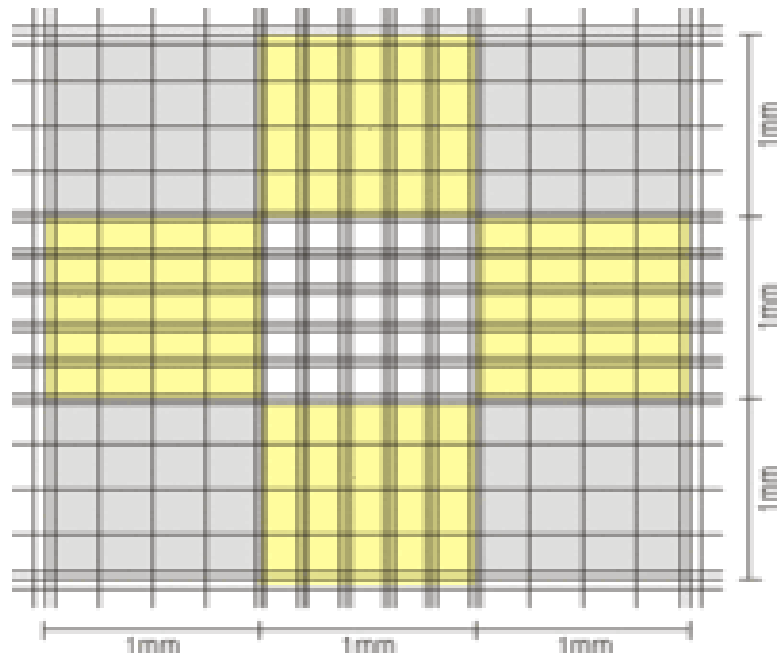


Abb. 4 Neubauer-Zählkammer (Quelle: Lindl 2000).

Fläche in einem Großquadrat:	$1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2$
Höhe über der Grundfläche:	$0,1 \text{ mm}$
Volumen eines Großquadrates:	$0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-1} \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ cm}^3 = 10^{-4} \text{ mL}$

Die Berechnung der Zellzahl erfolgt nach der folgenden Formel:

$$\text{Zellzahl} = \text{gezählte Zellen (4 Ecken)} \cdot \frac{2}{4} \cdot 10^{-4} \text{ Zellen/mL}$$

2.2.5 Probenvorbereitung (Suspendierung) der Zementstäube

Die einzelnen Zemente wurden dem Labor „verschlüsselt“ vom VDZ Düsseldorf zur Verfügung gestellt, so dass während der gesamten Arbeit kein Rückschluss auf Herkunft, Marke, Zusammensetzung etc. möglich war. Von diesen Proben wurden die Zementstäube G, H1, L, K, J, Titandioxid und Quarz untersucht. Zur Etablierung und Validierung der einzelnen, in dieser Arbeit verwendeten Testsysteme wurden anfangs Versuche mit einem einzigen zur Verfügung gestellten unbekannten Zement durchgeführt.

Zuerst wurden die Zementproben auf einer elektronischen Feinwaage abgewogen und in einzelnen Glasbehälter im Ofen bei 215°C über Nacht (ca. 16 Stunden) erhitzt. Damit wurden die vorhandenen Toxine deaktiviert. Nach der Abkühlung wurden zum Zementauflösen Hank`s Lösung dazugegeben.

Je nach gewünschter Konzentration musste die abgewogene Zementmenge in Gramm durch 1,520 geteilt werden. Zum Beispiel: 9,4 g Zement wird in 7,48 mL Hank`s Lösung gelöst ($9,4 : 1,520 = 6,18$) und damit beträgt Zementstaubkonzentration 400 µmol/L.

Die Zahl 1,520 ergibt sich aus der folgenden Rechnung: $3,801 \text{ cm}^2 \times 400 \text{ µmol/L} = 1,520$. Wobei $3,801 \text{ cm}^2$ ist die Fläche eines Loches der 12 er Lochplatte und 400 µmol/L ist die gewünschte Zementkonzentration.

In Hank`s Lösung gelöst, wurden die Proben dann gevortext und in einem Ultraschallbad mittels Ultraschall suspendiert (ca. 20 min.). Diese Stammlösung wurde dann mit Hank`s Lösung weiter verdünnt. Insgesamt wurden Zement-Staubkonzentrationen von 25 µg/cm², 50 µg/cm², 100 µg/cm² und 200 µg/cm² getestet. Vor jedem Pipettieren wurden die Suspensionen gevortext und mit der Pipette erneut vollständig resuspendiert. Somit wurde eine Sedimentierung bzw. Agglomeration verhindert. Als negative Kontrolle hat man Hank`s Lösung und TiO₂ benutzt. TiO₂ hat man nach dem gleichen Prinzip wie Zemente aufgelöst und verdünnt. Als positive Kontrolle diente DQ12 und H₂O₂. Die H₂O₂ - Lösung wurde bei jeder Versuchsreihe frisch angesetzt. Aus einer 30% Fertiglösung wurden 4,1 µL entnommen und in 10 mL Hank`s Lösung gelöst. Dies war die Stammlösung: 100 µL = 200 µmol, d.h.: für eine Konzentration von 200 µmol auf den Zellen (in die Löcher) musste man 100 µL Stammlösung pipettieren.

Nach dem Testen von verschiedenen Konzentrationen von H₂O₂ und DQ12 hat man sich für die Konzentrationen von H₂O₂ 50 µmol/L und DQ12 100 mg/cm² als positive Kontrolle entschieden.

2.2.6 WST-1

Der WST-1-Assay kann zur quantitativen Bestimmung der Zellvitalität benutzt werden. Der Endpunkt der Bestimmung im WST-1-Assay stellt die metabolische Aktivität der Zellen dar. Es wird die Aktivität des mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems fotometrisch bestimmt. WST-1 wird von zellularen mitochondrialen Dehydrogenasen in ein Formazan umgewandelt, dessen Farbintensität mittels Absorptionsmessung quantifiziert wird. Die Aktivität der Dehydrogenasen ist abhängig von der Stoffwechselrate der Zellen und demnach ebenso von deren Viabilität. Dieses System ist Teil der Atmungskette der Mitochondrien und nur in den metabolisch aktiven Zellen tätig. Den Zellen wird über das Medium WST-1-Reagenz angeboten. In den zellularen Mitochondrien wird das Tetrazoliumsalz zum gelben Formazan metabolisiert. Das hellrote Substrat WST-1 wird dabei von mitochondrialen Enzymen (vor allem Succinat-Dehydrogenase) der Zelle zum gelben Formazan reduziert (Roche Diagnostics, 1999). (Abb.5)

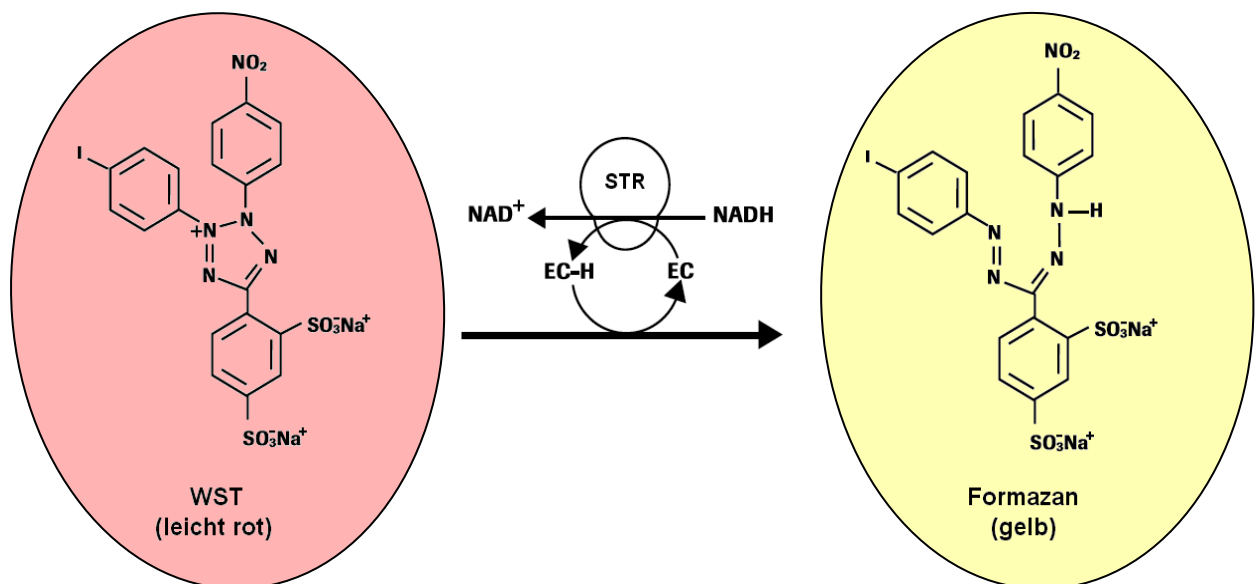


Abb. 5 Umsetzung von WST, Roche Diagnostics (1999), modifiziert.

Die Extinktion dieses wasserlöslichen Salzes lässt sich mit dem ELISA plate reader photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmen. Das Ergebnis korreliert direkt mit der Aktivität der mitochondrialen Enzyme der Zellen.

Der WST-1 Test wurde in einer 96-Multiloch-Platte (Abb.6) in drei unabhängigen Experimenten (N=3) mit jeweils 3 Wells pro Konzentrationspunkt durchgeführt.

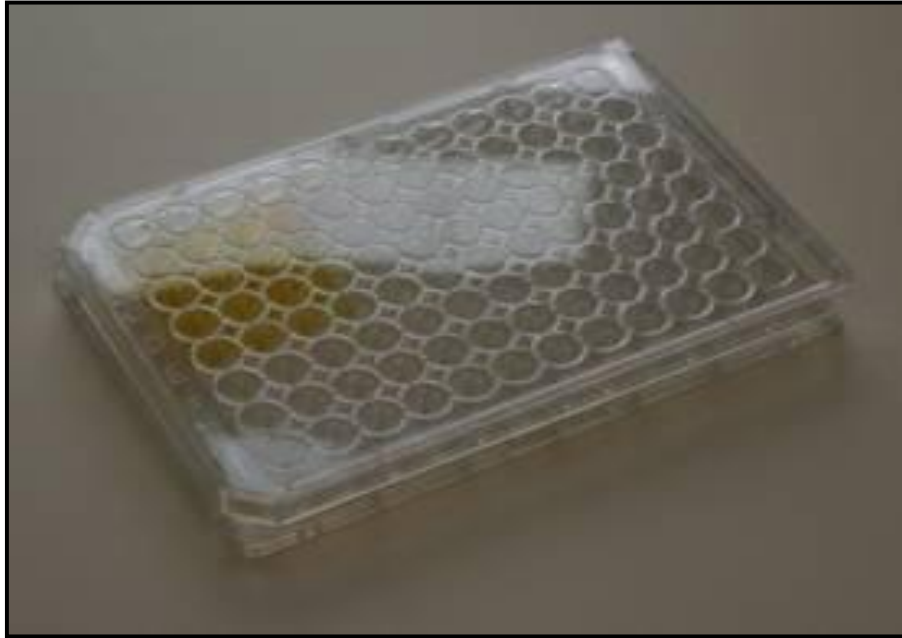


Abb. 6 Beispiel einer 96-Multilochplatte.

Tag 1

Zellaussaat (20.000 Zellen) 24 Stunden vor Experimentbeginn:

Vorher Austesten auf Subkonfluenz (ca. 90 %)

- Staub auswiegen (in Abhängigkeit von Waagenpräzision ca. 8-10 mg)
- Alle Stäube bei 215°C über Nacht (16 Stunden) hitzeaktivieren, um evtl. vorhandene Endotoxine zu zerstören

Tag 2 (Belastung)

vor Versuchsbeginn:

- Ansatz einer Stammlösung 400 µg/cm² in Medium
 96 Multilochplatte, 0,32 cm² Fläche, 200 µL Arbeitsvolumen bei 400 µg/cm², 128 µg / 0,32 cm² / 100 µL, 1280 µg/mL

Beispiel: bei Einwaage 8 mg Zement, wird 8: 1,28 = 6,25 mL Medium

Die Zahl 1,28 ergibt sich aus der folgenden Rechnung: $0,32 \text{ cm}^2 \times 400 \text{ µmol/L} = 1,28$.
 Wobei 0,32 cm² ist die Fläche eines Loches der 96 er Lochplatte und 400 µmol/L ist die gewünschte Zementkonzentration.

- Stammlösung zur besseren Suspension der Stäube 10 min schallen (Ultraschallbad mit 100 mL Wasser, Sonorex 120W, 50/60Hz)

Versuch:

- Medium von Zellen abschlagen
- 1 x mit PBS waschen (200 μ L pro Well)
- Zellen mit Medium 100 μ L bedecken, um Austrocknen zu vermeiden
- weiter Verdünnung der Stammlösung mit Medium auf Konzentrationen 400, 200, 100, 50 und 25 μ g/cm²

Stammlösung (1280 μ g/mL) bereits pipettiert, daraus Arbeitsverdünnungen herstellen: vor jedem Pipettieren vortexen und mit der Pipette erneut vollständig resuspendieren, um Sedimentierung / Agglomeration zu vermeiden.

Verdünnung für 200 μ g/cm² : 2 mL Stammlösung + 2 mL Medium = 4 mL, usw.

- positive Staubkontrolle (DQ12)
- negative Staubkontrolle (TiO₂)
- negative Kontrolle Medium
- positive Kontrolle (H₂O₂) 100 μ mol

Stammlösung H₂O₂: 4,1 μ L in 10 mL Hank's Lösung verdünnen

- je nach Konzentration von H₂O₂, wird bestimmte Menge von Stammlösung hinzugefügt (H₂O₂ 100 entspricht 50 μ L Stammlösung + 1950 μ L von Hanks` Lösung)
- 200 μ L der entsprechenden Testsubstanzen in die Löcher zugeben

Plattenbelegung:

DQ12	DQ12	DQ12	DQ12	Zem	Zem	Zem	Zem	TiO ₂	TiO ₂	TiO ₂	TiO ₂
400	200	100	50	400	200	100	50	400	200	100	50
400	200	100	50	400	200	100	50	400	200	100	50
400	200	100	50	400	200	100	50	400	200	100	50
400	200	100	50	400	200	100	50	400	200	100	50
Med	Med	DQ12	DQ12	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	Zem	Zem	Med	Med	TiO ₂	TiO ₂
0	0	25	12,5	50	100	25	12,5	0	0	25	12,5
0	0	25	12,5	50	100	25	12,5	0	0	25	12,5
0	0	25	12,5	50	100	25	12,5	0	0	25	12,5
0	0	25	12,5	50	100	25	12,5	0	0	25	12,5

Tag 3

- Lösungen abschlagen
- 2 x mit PBS waschen

WST-1 Assay:

- Färbelösung herstellen: 1 mL WST-1-Farb-Reaktionslösung + 19 mL DMEM
- vorsichtige Zugabe von 200 µL der Lösung in jedes Loch
- 1 Stunde Inkubation

Messung der Absorbance bei 450 nm/ 620 nm

2.2.7 Comet-Assay

Der Comet-Assay oder einzelne Zelle Gel-Elektrophorese (SCGE) Assay ist eine schnelle, empfindliche und relativ einfache Methode zum Nachweis von DNA-Schäden auf der Ebene einzelner Zellen (Singh et al., 1988). Der Comet-Assay wurde 1984 von Östling und Johanson zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen entwickelt. Im 1988 konnten der Singh durch die Verwendung von basischen Puffern zusätzlich auch DNA-Einzelstrangbrüche feststellen und so die Methode weiterentwickeln.

Der Comet-Assay ist inzwischen weitgehend als *in vitro*- und *in vivo* Gentoxizitätstest etabliert und es wurden Empfehlungen für eine standardisierte Testdurchführung publiziert (Tice et al., 2000). Da der Comet-Assay einfach und schnell durchzuführen ist und sich für ein breites Spektrum genotoxischer Substanzen als äußerst sensitiv

erwiesen hat, wird er auch als Methode des Biomonitoring verwendet (Übersichten bei Kassie et al., 2000; Moller et al., 2000).

Das Prinzip des Comet-Assays beruht darauf, dass die Zellen, in Agarose eingebettet, lysiert sind und einem elektrischen Feld ausgesetzt werden, der so genannten Elektrophorese. Während der Elektrophorese wandert die negativ geladene DNA zum Pluspol und dank der Poren in der Agarose trennen sich die Bruchstücke der Größe nach auf. Dabei legen die kleineren Bruchstücke in bestimmter Zeit eine weitere Strecke als die größeren zurück. Die chromosomale DNA ist jedoch zu groß, um als Ganzes im elektrischen Feld zu wandern. Nur geschädigte, bruchstückhafte DNA ist hier in der Lage, aus dem Zellkern herauszuwandern. Unter dem UV-Mikroskop erscheinen die beschädigten Zellen, welche vorher mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Ethidiumbromid angefärbt wurden, nun mit einem Schweif aus DNA Bruchstücken, der ihnen das Aussehen eines Kometen gibt (comet-assay forum, www.cometassayindia.org). (Abb.7)

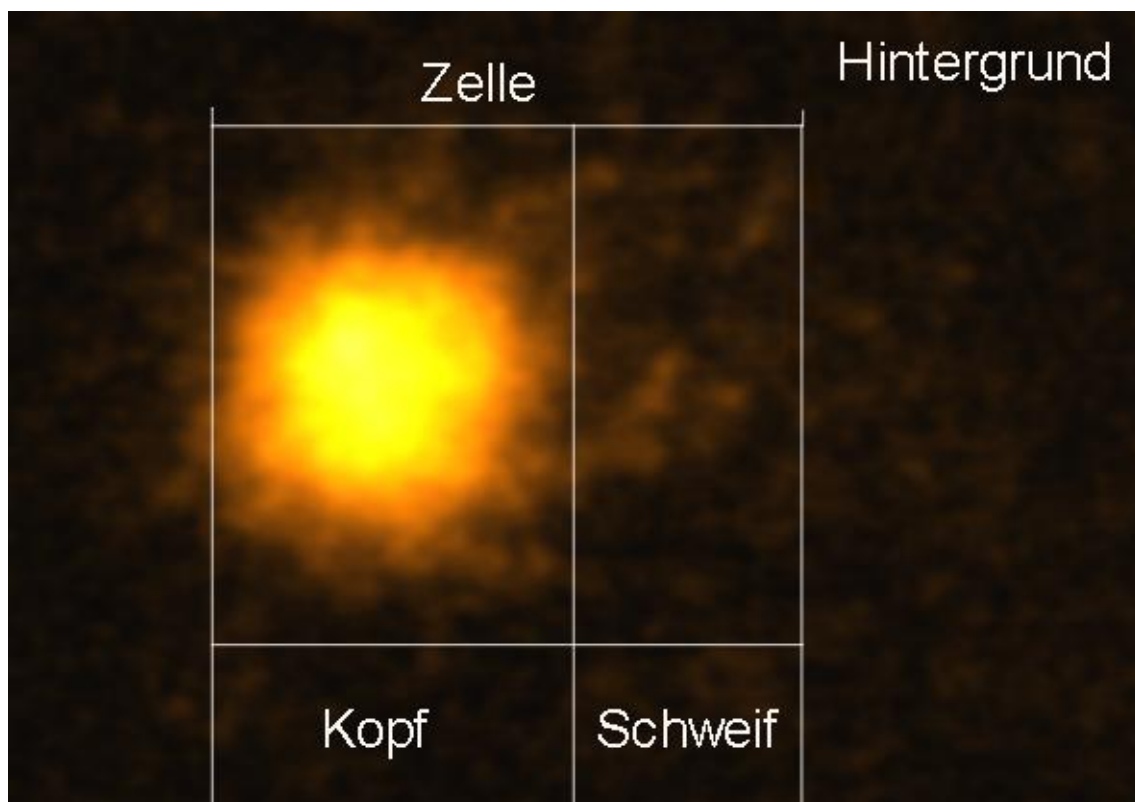


Abb. 7 Beispiel einer beschädigten Zelle mit Schweif aus DNA Bruchstücken.

Tag 1

Zellaussaat (100.000 Zellen) 24 Stunden vor Experimentbeginn:

- Zementstaub auswiegen (in Abhängigkeit von Waagenpräzision ca. 8-10 mg)
- Alle Stäube bei 215°C über Nacht (16 Stunden) hitzeaktivieren, um evtl. vorhandene Endotoxine zu zerstören

Tag 2 (Belastung)

vor Versuchsbeginn:

- Ansatz einer Stammlösung 400 µg/1cm² in Hank's Lösung in einer 12 Lochplatte
Beispiel: bei Einwaage 8 mg Zement, wird 8: 1,520 = 5,26 mL Hank's Lösung für 400 µg/cm² Zementkonzentration.
- Stammlösung zur besseren Suspension der Stäube 10 min schallen (Ultraschallbad mit 100 mL Wasser, Sonorex 120W, 50/60Hz)

Versuch:

- Medium von Zellen abschlagen
- 1 x mit PBS waschen (2 mL pro Loch)
- Zellen mit Hank's Lösung 1 mL bedecken, um Austrocknen zu vermeiden
- weiter Verdünnung der Stammlösung mit Hank's Lösung auf Konzentrationen 200, 100, 50 und 25 µg/cm²

Stammlösung bereits pipettiert, daraus Arbeitsverdünnungen herstellen:

vor jedem Pipettieren vortexen und mit Pipette erneut vollständig resuspendieren, um Sedimentierung / Agglomeration zu vermeiden

Verdünnung für 200 µg/cm² : 2 mL Stammlösung + 2 mL Hank's Lösung = 4 mL, usw.

- positive Staubkontrolle (DQ12)
- negative Staubkontrolle (TiO₂)
- negative Kontrolle Hank's Lösung
- positive Kontrolle (H₂O₂)

Stammlösung H₂O₂: 4,1 µL in 10 mL Hank's Lösung verdünnen

- je nach Konzentration von H₂O₂, wird bestimmte Menge von Stammlösung hinzugefügt (H₂O₂ 100 entspricht 50 µL Stammlösung + 1950 µL von BBP)
- 1 mL der entsprechenden Testsubstanzen in die Löcher zugeben

z.B.:

Hank's Lösung	Zement 200	Zement 100	Zement 50
Zement 25	DQ12 200	DQ12 100	DQ12 50
H ₂ O ₂ 100	Ti ₂ O ₂ 200	Ti ₂ O ₂ 100	Ti ₂ O ₂ 50

- 4 Stunden Inkubationszeit

Objektträgerbeschichtung:

1. Schicht

- Objektträger mit Ethanol und Aceton vorbehandeln
- in 1% Agarose tauchen, auf Papier abtropfen, Rückseite abwischen
- in Rack stellen
- 24 Stunden bei 37°C in Inkubator (Rack offen!!) stellen
- danach bei Raumtemperatur aufbewahren

2. Schicht

- 100 µL 0,7% Agarose auftropfen
- mit Deckglas abdecken
- bis zum Gebrauch bei 4 °C auf Tablett aufbewahren

3. Schicht

- 0,5% LMP-Agarose unter Rühren aufkochen
- auf Heizplatte bei 37°C unter Rühren warm halten

Ernte nach 4 Stunden

- 100 µL 0,7% Agarose (II) auf Objektträger pipettieren
- mit Deckglas abdecken
- mindestens 15 min. bei 4°C kühlen
- 200 mL Lyselösung ansetzen und in Schiefferdeckerkammer bei 4°C lagern
- Überstand absaugen (eventuell aufbewahren)
- 2 x mit 1 mL PBS waschen
- 300 µL Trypsin zugeben
- 5' / 37°C inkubieren (je nach Zelllinie)
- mit 0,7 mL Vollmedium stoppen
- Zellsuspension in 10 mL Standröhrchen (oder in 1,5 mL Eppendorf) überführen

Ab hier im Dunkeln arbeiten!!

- Zellzahlbestimmung / Vitalkontrolle: 50 µL Zellsuspension + 50 µL Ery. B-Lösung in 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen mischen
- Zellzahl bestimmen (siehe 2.2.4)
- Zentrifugieren bei 4°C , Programm 4 wählen (1200 rpm für 5 Minuten)

In dieser Zeit:

- Metallkiste mit Eis füllen, auf Tablett stürzen
- Objektträger aus Kühlschrank nehmen
- Mit Edding beschriften, Deckgläser abziehen

!! Die Auswertung hat blind zu erfolgen = die Objektträger sind daher zu kodieren (nach GLP)

- Nach dem Zentrifugieren Standröhrchen aus Zentrifuge rausnehmen und überstand in den Restabfall kippen
- Röhrchen mit der Öffnung nach unten 5 Minuten abtropfen lassen
- 100 µg Agarose 0,5% in die Röhrchen geben, vorsichtig und gründlich resuspendieren
- Zell-Agarose-Lösung auf Slide pipettieren und mit Deckglas abdecken
- Auf Kühlplatte legen
- 15 min. inkubieren, damit Agarose erstarrt

Tag 2 oder 3 (Lysis)

- die Deckplättchen vorsichtig entfernen
- Objektträger in den Träger stellen (max. 20 St / Kammer)
- Für mindestens eine Stunde oder über Nacht bei 4°C in die Lyselösung stellen

Vorbereitung zur Elektrophorese

- ½ h vorher Kühlung der Elektrophoresekammer einschalten (-4°C)
- Elektrophoresepuffer in die Kammer füllen (ca.1200-1300 mL)
- die Lyselösung aus dem Träger mit Objektträger verwerfen
- Objektträger in die Elektrophoresekammer einsortieren – Beschriftung rechts
- 20 Min. inkubieren

Elektrophorese

- Power Supply einschalten
- Parameter: 300 mA, 25 V, 25 Min.
- Einstellen von V und mA: < 300 mA – Puffer zugeben; < 25 V – Puffer entfernen
- 25 Min. inkubieren

Neutralisation

- Objektträger in Schiefferdecker-Kammer einsortieren
- Neutralisationspuffer zugeben
- 10 Min. bei 4°C inkubieren
- Puffer verwerfen
- Objektträger 2 x mit destilliertes Wasser spülen
- Objektträger für 10 Min. auf Tuch abtropfen lassen

Färbung

- 60 µL Ethidiumbromid auf jeden Objektträger pipettieren
- Für TiO₂: Objektträger in einen Behälter mit Acridine-Orange –Lösung für 10 Sekunden eintauchen dann 2 mal mit PBS spülen
- Deckgläschen auflegen

Auswertung

Die Auswertung der Objektträger erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop DMLS. Hier wurden die mit Etidiumbromid angefärbten Objektträger mit Hilfe einer 400- fachen Vergrößerung ausgewertet. (Abb. 8)

Die Präparate mit Ethidiumbromid gefärbten TiO₂ konnten nicht ausgewertet werden, da sie unter Mikroskop zu sehr geleuchtet (fluoresziert) haben, sodass eine genauere Abtrennung zwischen einen Schweiß und einen Kopf nicht möglich war.

Bei der Färbung mit Acridine-Orange, konnte die Auswertung der TiO₂-Objektträger problemlos erfolgen, da die Fluoreszenz nicht so stark, wie bei der Färbung mit Etidiumbromid, war.

Um eine blinde Auswertung zu gewährleisten, wurden die Prüfsubstanzen vom Projektleiter vor der Aushändigung an den Untersucher mit den Buchstaben (G, H1, K,

L, J + Kontrollen, Titandioxid, DQ12) kodiert. Ebenso erfolgte eine Kodierung vor der Auswertung, so dass bei der Auszählung weder Stoff, noch Konzentration bekannt waren („blinde“ Auswertung). Ausgewertet wird die Zahl der geschädigten und ungeschädigten Zellkerne durch spezielle Computerprogramme mit visueller Erfassung. Pro Objektträger wurden 100 zufällig ausgewählten Zellen mit den gut erkennbaren Zellkernen gezählt. 70% allen DNA-Materials musste innerhalb der Zelle bleiben. Wenn mehr als 30% DNA außerhalb der Zelle (im Schweif) war, wurde die Zelle nicht ausgewertet, da es sich hier um eine totale Zerstörung der Zelle handelte. (Abb. 9, 10)

Als Maß für die DNA-Schädigung war der so genannte Olive Tail Moment (OTM) herangezogen. Es wurden die Mittelwerte von OTM aus 3 unabhängigen Experimenten ermittelt. Unterschiede zwischen der unbehandelten Kontrolle und den Zementstäuben-exponierten Zellen wurden mit dem t-Test auf Signifikanz ($p < 0,05$) untersucht. Ein Zementstaub wurde als eindeutig DNA-schädigend eingestuft, wenn er in der Lage war, die spontan auftretende DNA-Schädigung mindestens in zwei Konzentrationen signifikant zu erhöhen.

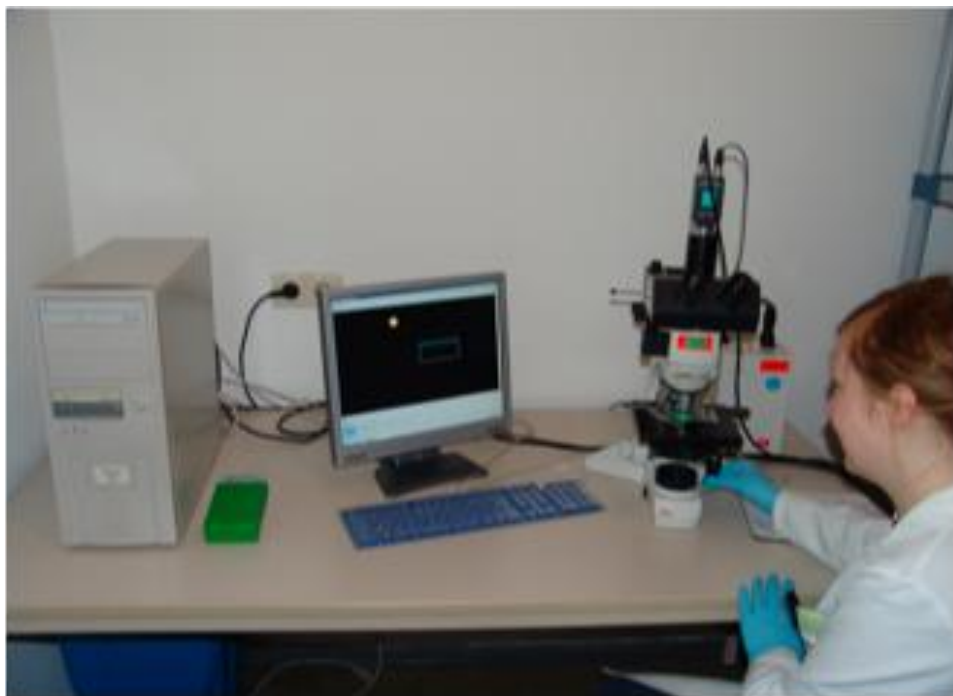


Abb. 8 Die Abbildung zeigt den Computerplatz, an dem die mit Etidiumbromid angefärbten Zellen ausgewertet wurden.

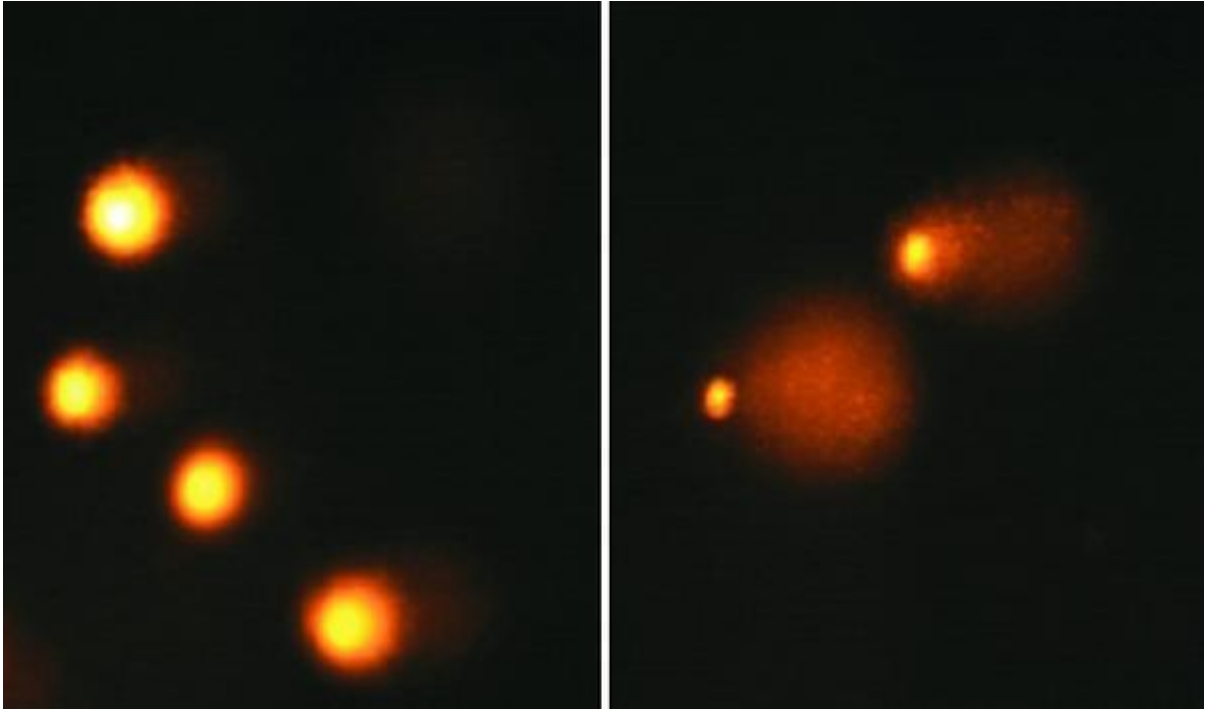


Abb. 9 Beispiele von ungeschädigten Zellen (Lösungsmittelkontrolle) (links) und durch H₂O₂ geschädigten Zellen (Geisterkometen) (rechts).

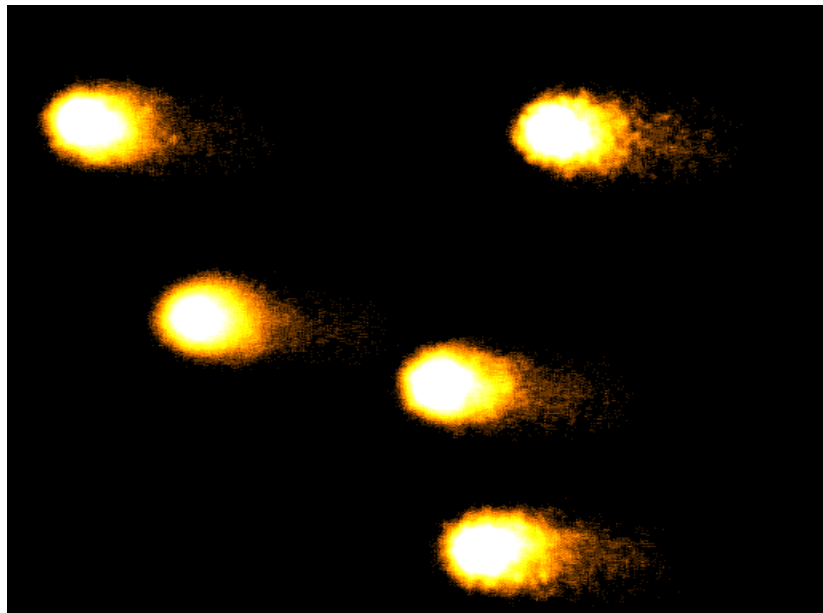


Abb. 10 Beispiel von durch DQ 12 geschädigten Zellen mit Schweif.

2.2.8 Statistik

Nach der Auswertung der Präparate im Comet-Assay wurden die Ergebnisse auf Basis der Kodierungen den jeweiligen Zementstäuben und Kontrollen zugeordnet. Die bei der Auszählung ermittelten Daten wurden im Labor protokolliert, in eine Microsoft Excel Tabelle übertragen und auf Vollständigkeit und Richtigkeit hin überprüft. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test (Anzuwenden bei Stichproben mit ungleicher Varianz) mittels Programm Microsoft Excel durchgeführt. Dabei wurden die Mittelwerte der Prüfsubstanzen im Vergleich zur Mediumkontrolle berechnet. Dabei geben die auf vier Stellen hinter Komma gerundete Ergebnisse Auskunft über den Grad der Signifikanz. Die Werte von $p < 0,05$ und $p < 0,01$ wurden als signifikant (*) und (**), die Werte von $p < 0,001$ als hochsignifikant (***) eingestuft.

3. Ergebnisse

3.1 Chemische, physikalische Charakterisierung der untersuchten Zementstäube

Für die Untersuchungen wurde ein repräsentativer Satz an Zementstäuben mit der Bezeichnung G, K, L, H1 und J von VDZ, Düsseldorf, bereitgestellt. Eine chemische Analyse der Zementstäube erfolgte auf Makrokomponenten wie z.B. SiO_2 oder CaO (Tab. 3) und auf Schwermetalle wie z.B. Zink oder Kupfer (Tab. 4) und wurde vom Analytiklabor des VDZ in Düsseldorf durchgeführt. Die Ergebnisse wurden uns freundlicherweise vom VDZ, Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

Makrokomponenten in den untersuchten Zementen G, H1, J, K, L

	Backstein	Kalksteinmehl	A	B	C	D	G	H1	J	K	L
CO_2	0,63	43,76	1,56	7,29	15,65	1,43	3,33	2,8	4,0	14,6	10,48
H_2O	0,81	0,30	2,64	1,77	2,23	3,75	5,61	4,56	1,41	2,83	3,11
SiO_2	19,45	0,61	29,01	20,12	14,76	17,51	29,92	16,26	25,97	11,36	15,1
Al_2O_3	5,70	0,30	8,11	7,62	3,25	5,49	11,3	3,94	9,98	3,18	6,05
TiO_2	0,27	0,04	0,33	0,35	0,17	0,34	0,5	0,2	0,66	0,16	0,23
P_2O_5	0,23	0,01	0,26	0,14	0,09	0,09	0,17	0,25	0,13	0,06	0,06
Fe_2O_3	2,79	0,07	3,31	3,78	1,24	2,73	4,74	2,22	1,27	2,55	2,88
Mn_2O_3	0,06	0,04	0,1	0,06	0,04	0,15	0,17	0,05	0,15	0,07	0,04
MgO	3,44	0,49	1,0	1,84	0,73	3,39	1,83	2,27	4,07	1,34	1,67
CaO	60,25	54,18	48,58	45,35	53,91	54,59	33,48	60,85	47,64	55,26	48,24
SO_3	3,20	0,05	2,28	9,1	6,74	7,89	4,5	3,59	3,76	7,18	7,51
K_2O	2,78	0,09	1,7	2,34	1,05	2,22	3,39	2,37	0,7	1,35	4,17
Na_2O	0,41	0,03	1,14	0,29	0,2	0,47	1,01	0,62	0,36	0,12	0,33

Tab. 3 Chemische Zusammensetzung der untersuchten Zemente. Alle Angaben in %
(Daten freundlicherweise durch VDZ Düsseldorf zur Verfügung gestellt).

Schwermetallen in den untersuchten Zementen G, H1, J, K, L

	Back-stein	Kalkstein-mehl	A	B	C	D	G	H1	J	K	L
As	4,23	4,53	5,61	15,8	3,57	6,11	8,48	4,93	2,21	34,3	8,68
Be	1,03	0,14	1,53	1,04	0,4	1,21	2,63	1,33	3,04	0,55	0,93
Cd	0,58	0,17	1,49	1,51	0,74	0,98	0,31	0,18	0,51	0,56	2,15
Co	5,73	1,01	8,2	12,1	4,61	10,6	15,6	25,7	3,84	8,98	10,6
Cr	144	4,71	155	140	224	240	227	429	65	155	353
Cu	81,2	1,54	47,9	46,2	88	41,4	47,7	21,8	32	43,8	50,9
Hg	0,02	0,02	0,05	0,08	0,04	0,14	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Mn	311	231	6,67	377	274	1035	1144	456	819	457	304
Ni	70,6	5,52	84,7	103	163	104	107	211	48,2	85,8	107
Pb	37,6	18,6	33,2	11,2	25,1	15,5	17,3	1,89	7,02	12,6	70,2
Sb	1	1	22,7	2,41	3,27	6,53	6,01	1	14,2	3,21	3,18
Sn	1	30,8	43,4	13,9	13	12,4	16	2,79	30,8	14,4	41,3
Tl	0,5	0,5	0,83	3,11	1,97	1,17	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
V	30,9	3,1	46	134	21,7	66,1	136	192	191	54,8	89,6
Zn	641	60,5	171	213	126	274	426	714	100	427	536
Te	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Se	1	1	1	2,25	1	1	1	1	1	1	1

Tab. 4 Spuren an Schwermetallen in untersuchten Zementen. Alle Angaben in ppm
(Daten freundlicherweise durch VDZ Düsseldorf zur Verfügung gestellt).

Die untersuchten Zementstäube wurden mittels ZZ-Zichter in Größenklassen fraktioniert um mittlere Durchmesser von 1 bis 3 µm zu erhalten, wobei alle Stäube kleiner als 10 µm waren. Die Korngrößenverteilung wurde mit dem CILAS 1064 am VDZ, Düsseldorf, durchgeführt.

Mittels Lichtmikroskop wurde die Morphologie der A549-Zellen sowie die Partikelinternalisierung nach Exposition für 2, 4 und 48 Stunden beobachtet. Bei einer Vergrößerung von 320-fach wurde deutlich sichtbar, dass Quarz DQ12 und Titandioxid in die Zellen aufgenommen wurden, wogegen die Zementstäube nur auf den Zellen deponiert und nicht internalisiert werden.

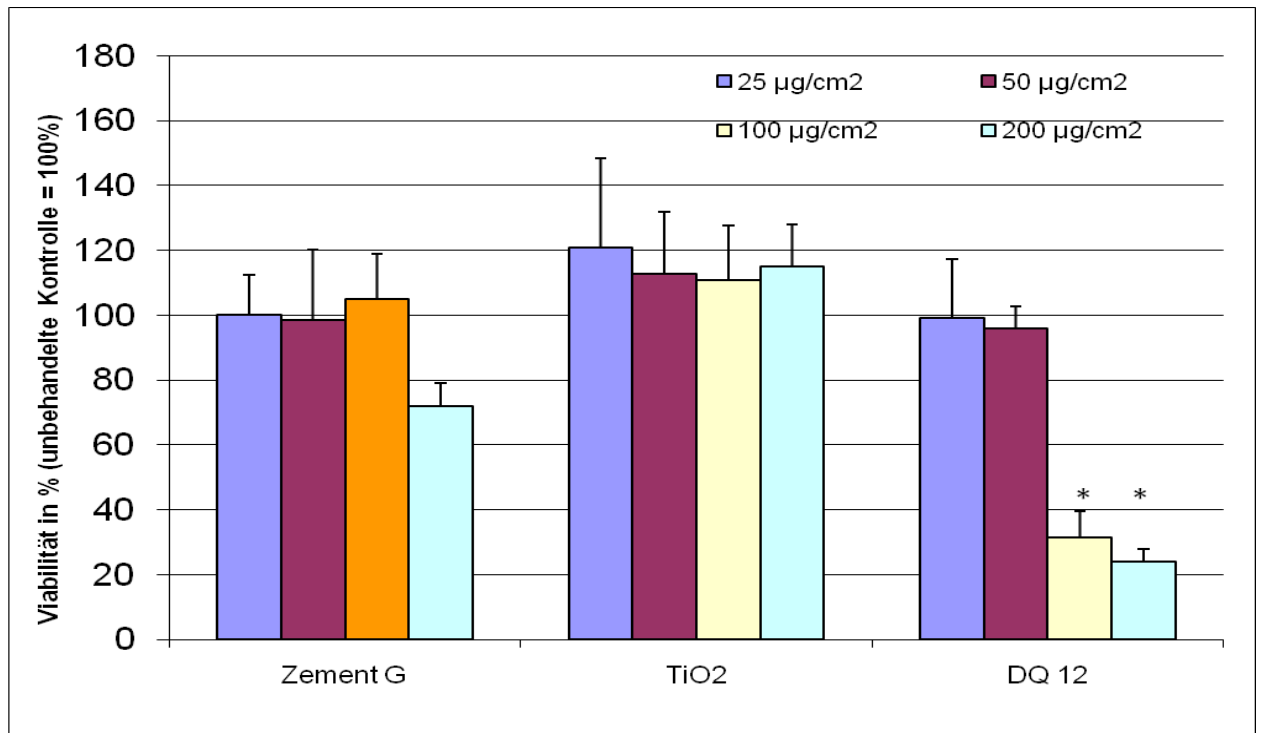
3.2 Toxikologische Untersuchungen der Zementstäube

3.2.1 Zytotoxische Wirkung

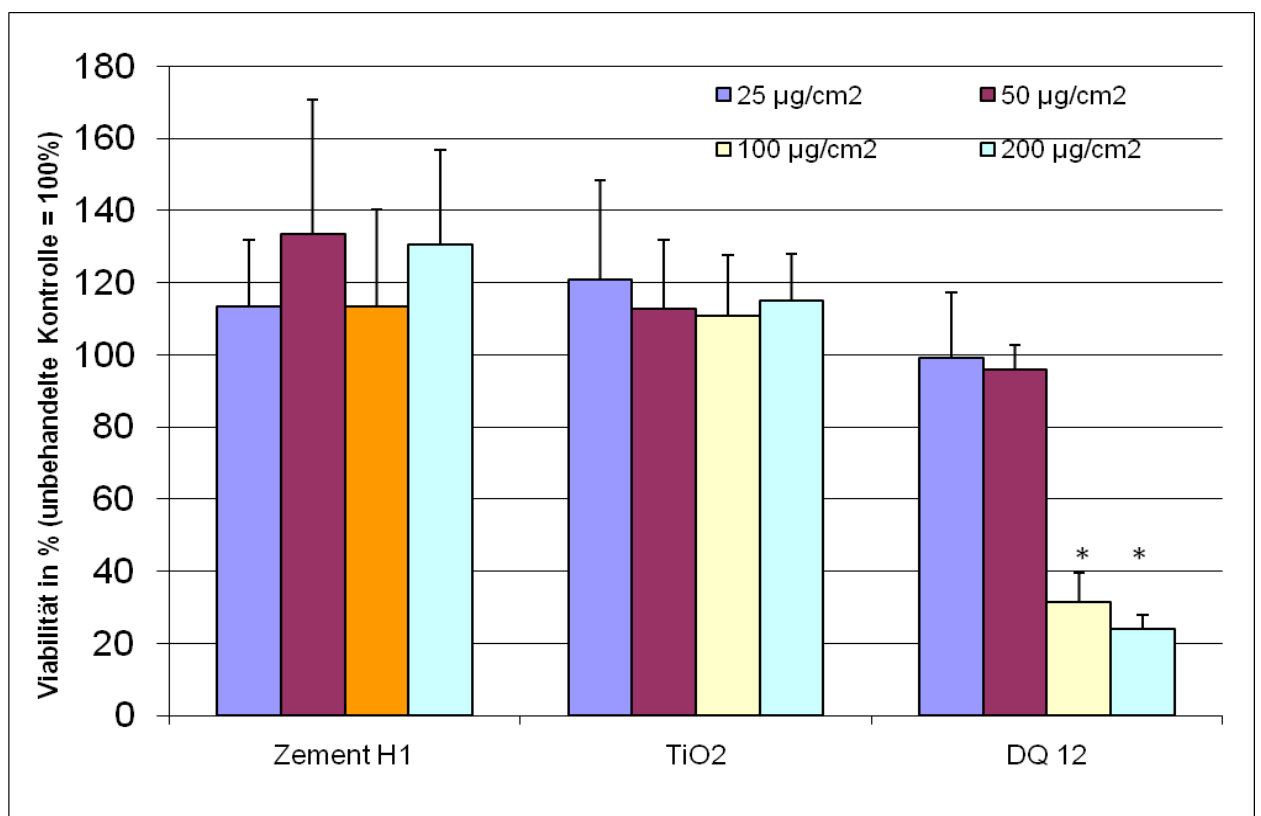
Zur Untersuchung der akut zytotoxischen Wirkung von Zementstäuben wurde der WST-Assay, der auf der Analyse der Funktionalität der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität der Zellen basiert, angewandt. Hierfür wurden A549-Zellen für 4 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Stäuben behandelt. Das Ergebnis zeigt, dass die mitochondriale Aktivität der A549-Zellen trotz steigenden Staubkonzentrationen nicht beeinträchtigt wurde. Für Quarz DQ12 konnte nach einer 4-stündigen Inkubation für die Konzentrationen 100 und 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine akute Toxizität nachgewiesen werden, während die Viabilität bei niedrigen Konzentrationen bei etwa 100% lag. Damit ergab der WST-1 Test für die getesteten Zementstäube kaum Effekte auf die Zellviabilität.

Signifikante Abweichungen von den entsprechenden Negativkontrollen sind mit dem jeweiligen Signifikanzniveau p markiert ($p < 0,01 = **$, $p < 0,05 = *$, $p > 0,5 =$ nicht signifikant). Bei den positiven Kontrollen DQ12 100 und 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ lassen sich folgende signifikante Effekte erkennen: für DQ 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ $p = 0,0328$; für DQ 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ $p = 0,0337$. (Abb.11)

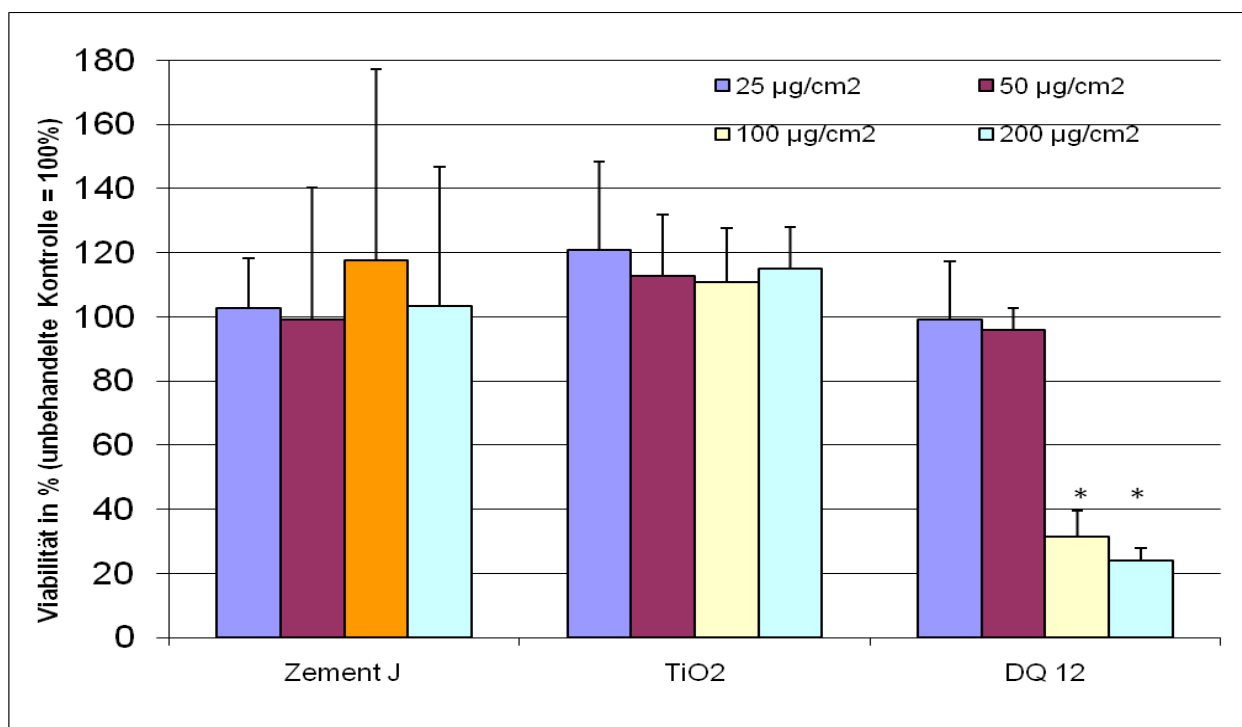
Zement G



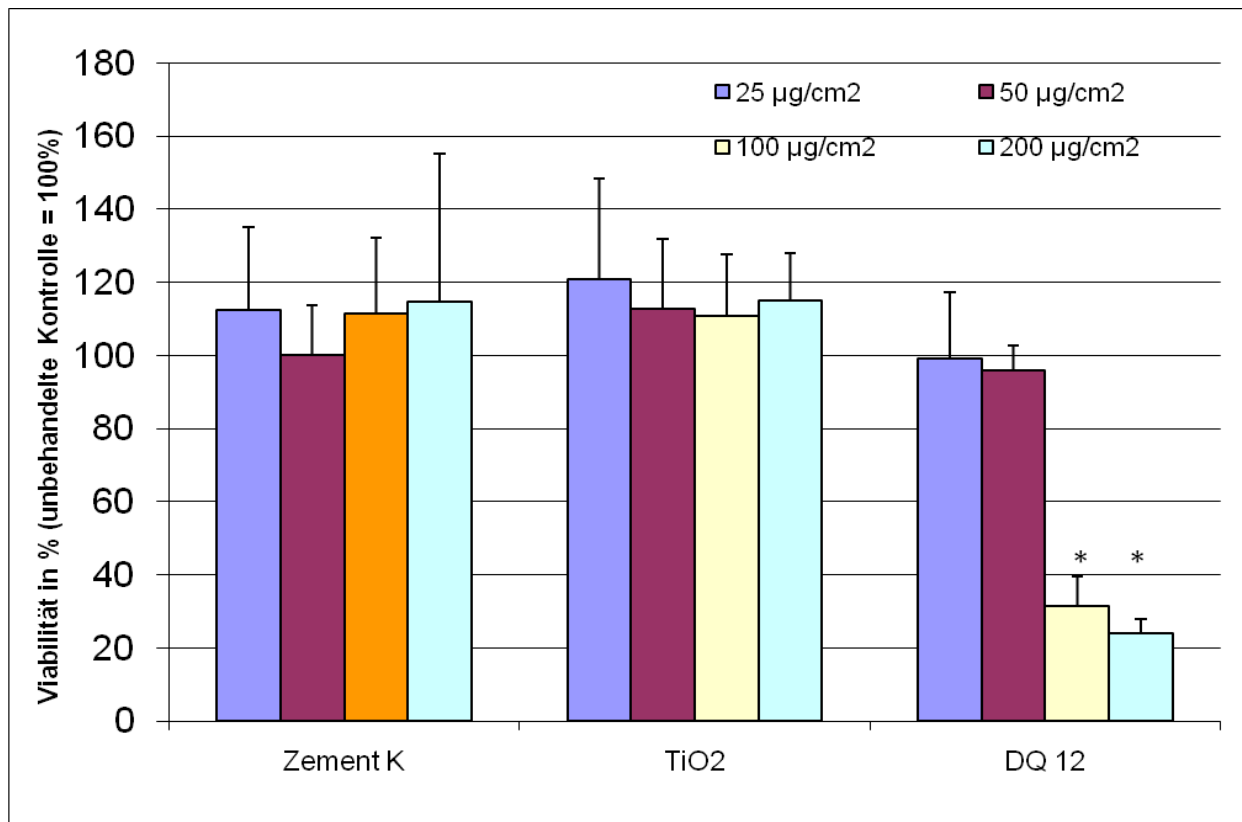
Zement H1



Zement J



Zement K



Zement L

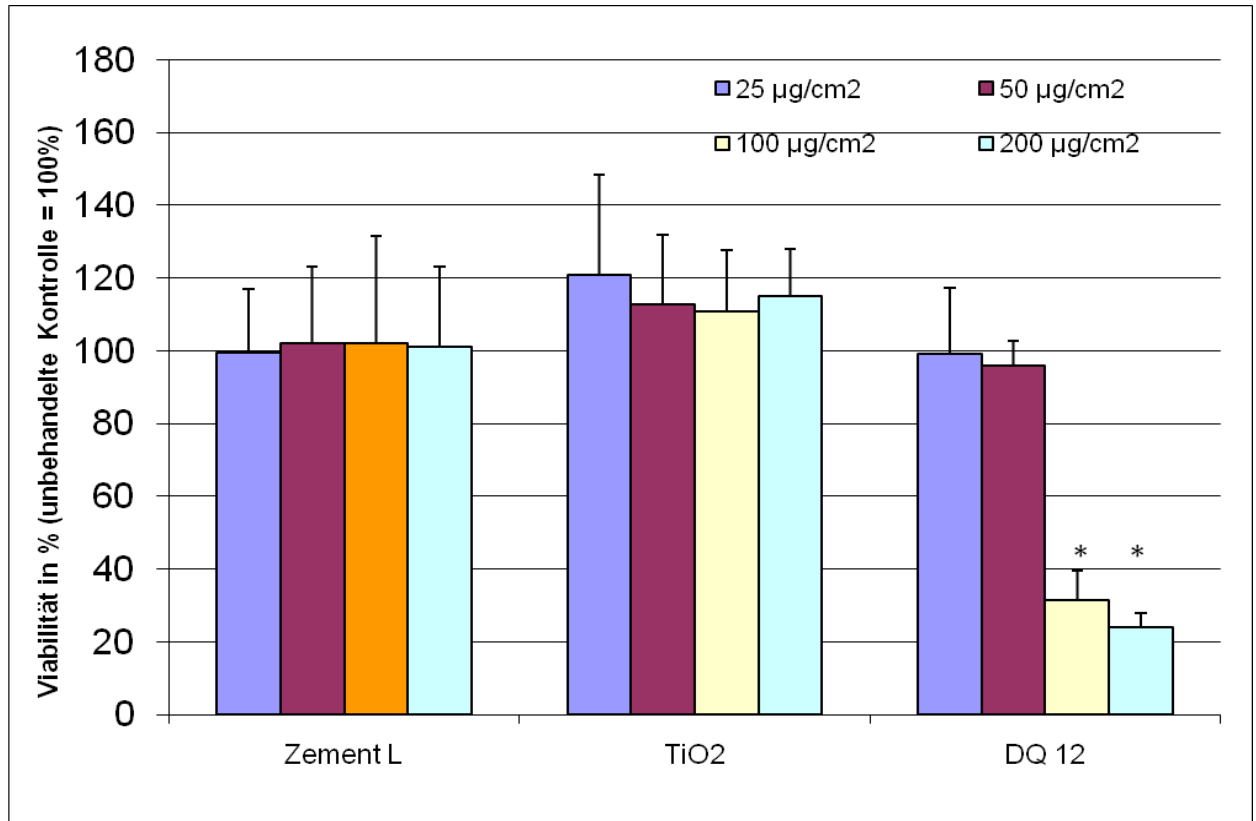


Abb. 11 Effekt von Zementstäuben auf die Viabilität von Lungenepithelzellen A549 gemessen im WST-Assay. Y-Achse: Viabilität der behandelten Zellen in % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im jeweiligen Experiment.

Bestimmung der Zellvitalität von A549-Zellen mit Hilfe des WST-1 Tests nach einer 4-stündigen Inkubation mit Zementstäuben (25, 50, 100 und 200 µg/cm²). Die angegebenen Werte sind auf die Viabilität der unbehandelten Kontrollzellen bezogen und stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± SD dar (*p < 0,05).

3.2.2 Genotoxische Wirkung

Der Einfluss der einzelnen Stäube auf genotoxische Wirkung in A549-Lungenzellen nach 4 Stunden Exposition wurde mit dem Comet-Assay geprüft. Die Ergebnisse der Untersuchung zur potentiellen Genotoxizität der Positivkontrollen Wasserstoffsuperoxid und Quarz DQ12 sowie der Zementstäube sind in der Abbildung 11 dargestellt. Sie zeigen jeweils Mittelwert, Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Abweichungen von den entsprechenden Negativkontrollen sind mit dem jeweiligen Signifikanzniveau p markiert ($p < 0,01 = **$, $p < 0,05 = *$, $p > 0,5 =$ nicht signifikant). Die Positivkontrollen DQ12 und H_2O_2 lagen in allen Untersuchungen signifikant über der Kontrolle.

Quarz DQ12

Für Quarz DQ12 fanden sich in den Konzentrationen 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf Grund der Viabilität keine Anzeichen von Zytotoxizität (weniger als 70% wird als Zytotox bezeichnet). Bei den Konzentrationen 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ tritt schon eine zytotoxische Reaktion auf. Die Induktion von Komet in A549-Zellen nach 4 stündiger Exposition mit Quarz-Suspensionen und einer 4 stündiger Exposition mit H_2O_2 sind in Abb.12 dargestellt. Für Quarz liegt ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine signifikante Erhöhung von OTM ($p = 0,0412$) vor. Die für Quarz am stärksten wirksamste Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ mit $2,57 \pm 0,47$ OTM pro 100 Zellen unterscheidet sich deutlich von der Kontrolle mit $0,71 \pm 0,16$ OTM pro 100 Zellen ($p = 0,0208$). Die Positivkontrolle H_2O_2 in der Konzentration 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ induziert ebenfalls DNA-Migration ($p = 0,0412$).

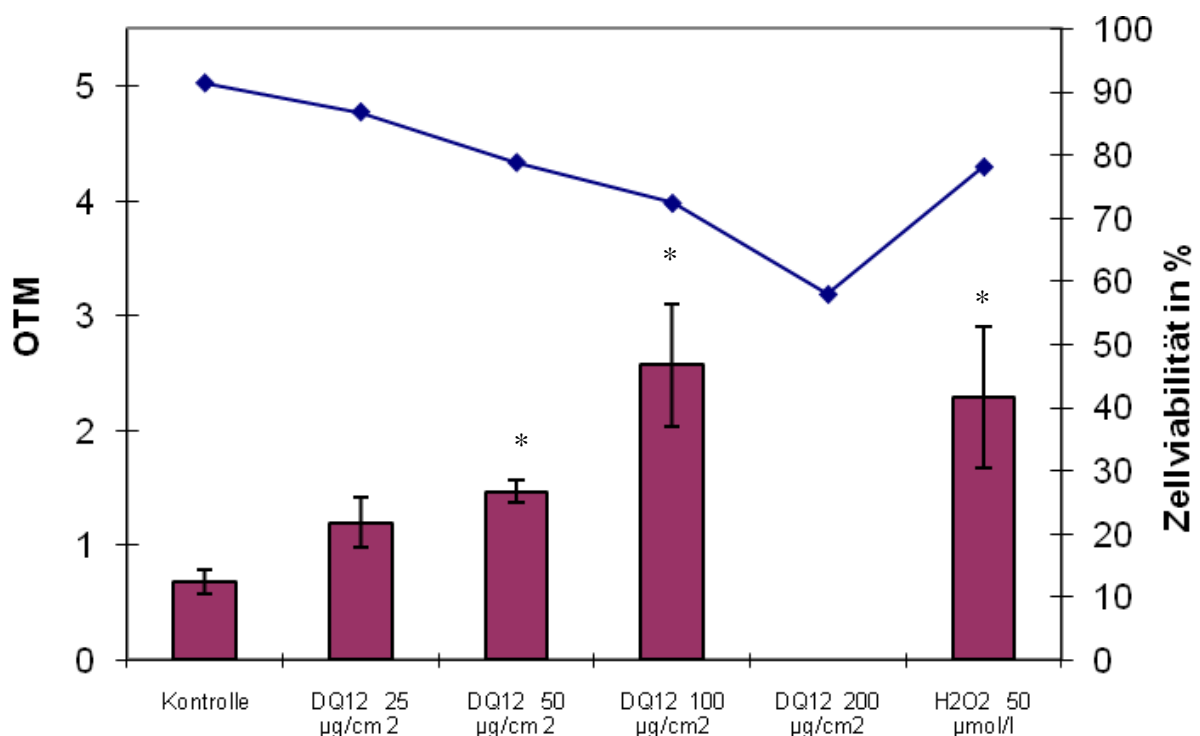


Abb. 12 Vitalität (Linien) und OTM (Säulen) in Lungenepithelzellen A549 nach Exposition gegenüber der Positivkontrolle Quarz DQ12 und Wasserstoffperoxid. Die Daten für den Comet-Assay sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) (* $p < 0,05$).

Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Der Viabilitätstest zeigte für die Positivkontrolle H₂O₂ in den Konzentrationen 25, 50 und 100 µmol/L (Abb.13) eine Reduktion der Viabilität. Die Induktion von Kometen in A549-Zellen nach 4 stündiger Exposition mit H₂O₂ ist in Abb.13 dargestellt. Insgesamt ist eine konzentrationsabhängige Induktion der Kometengröße bis zur Konzentration von 200 µmol/L zu erkennen. Eine signifikante Erhöhung der DNA-Migration liegt ab einer Konzentration von 25 µmol/L vor ($p = 0,0458$) (bei der Konzentration 50 µmol/L ist $p = 0,0412$).

Die am stärksten wirksame Konzentration von 100 µmol/L mit $4,49 \pm 0,82$ OTM pro 100 Zellen unterscheidet sich deutlich von der Kontrolle mit $0,71 \pm 0,16$ pro 100 Zellen ($p = 0,0178$). Bei der Konzentration 200 µmol/L waren die meisten Zellen zerstört, man hat überwiegend die Geisterkometen festgestellt.

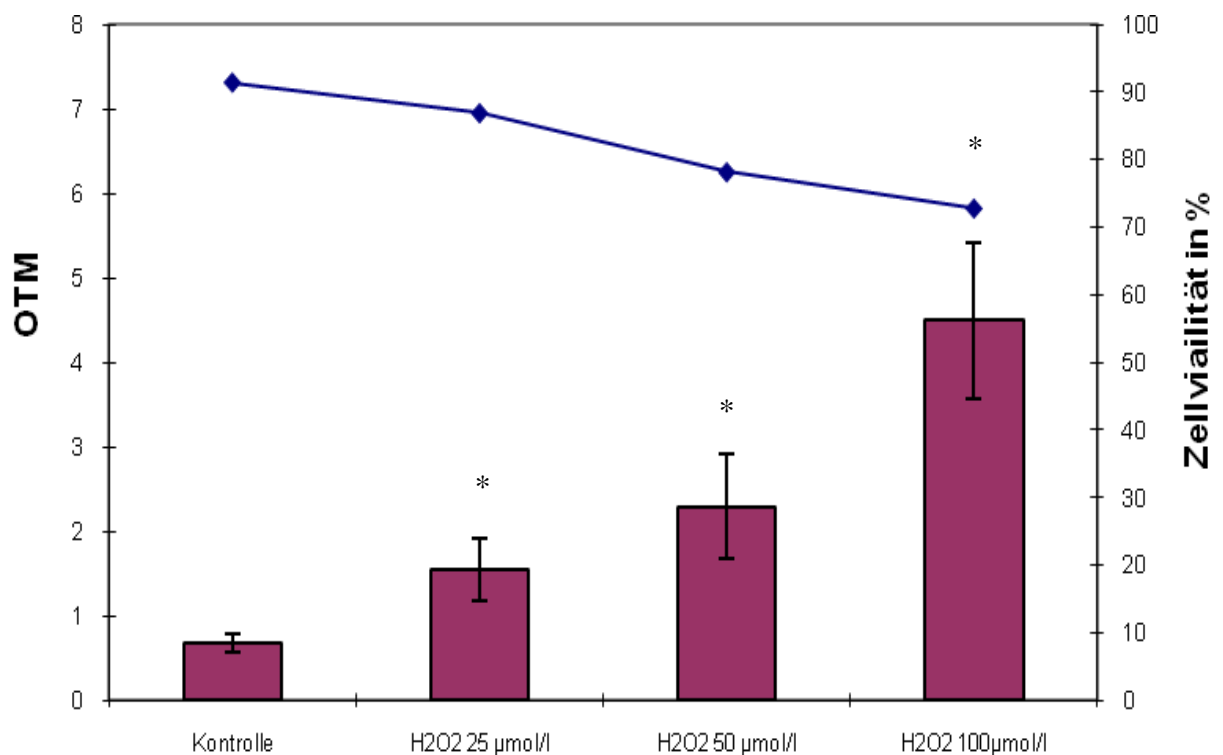


Abb. 13 Vitalität (Linien) und OTM (Säulen) in Lungenepithelzellen A549 nach Exposition gegenüber der Positivkontrolle H₂O₂. Die Daten für den Comet-Assay sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) (* $p < 0,05$).

Titaniumdioxid (TiO₂)

Für TiO₂ fanden sich in den Konzentrationen 25 µg/cm², 50 µg/cm², 100 µg/cm² und 200 µg/cm² auf Grund der Viabilität keine Anzeichen von der Zytotoxizität. Die Induktion von Kometen in A549-Zellen nach 4 stündiger Exposition mit TiO₂-Suspensionen ist in Abb.14 dargestellt. Für TiO₂ liegt bei Konzentrationen 25 µg/cm², 50 µg/cm² und 100 µg/cm² keine signifikante Erhöhung der Kometenzahl vor.

Lediglich bei der Konzentration 200 µg/cm² zeigt sich, im Vergleich zur anderen Konzentration und zur Kontrolle, eine signifikante Erhöhung des Olive Tail Moments (OTM) ($p = 0,0279$). Allerdings liegt der OTM auch bei dieser Konzentration < 1 , so, dass auch in der höchsten getesteten Konzentration keine übermäßige DNA-Migration zu beobachten ist.

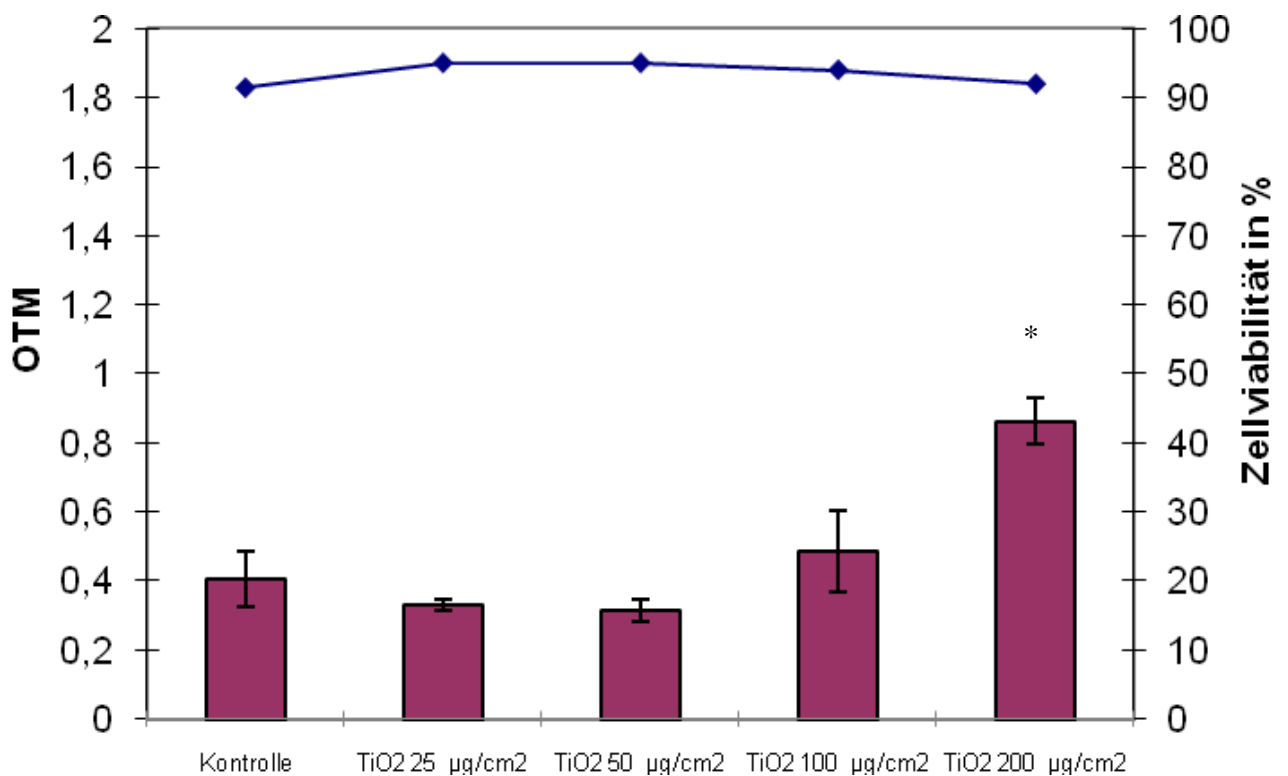
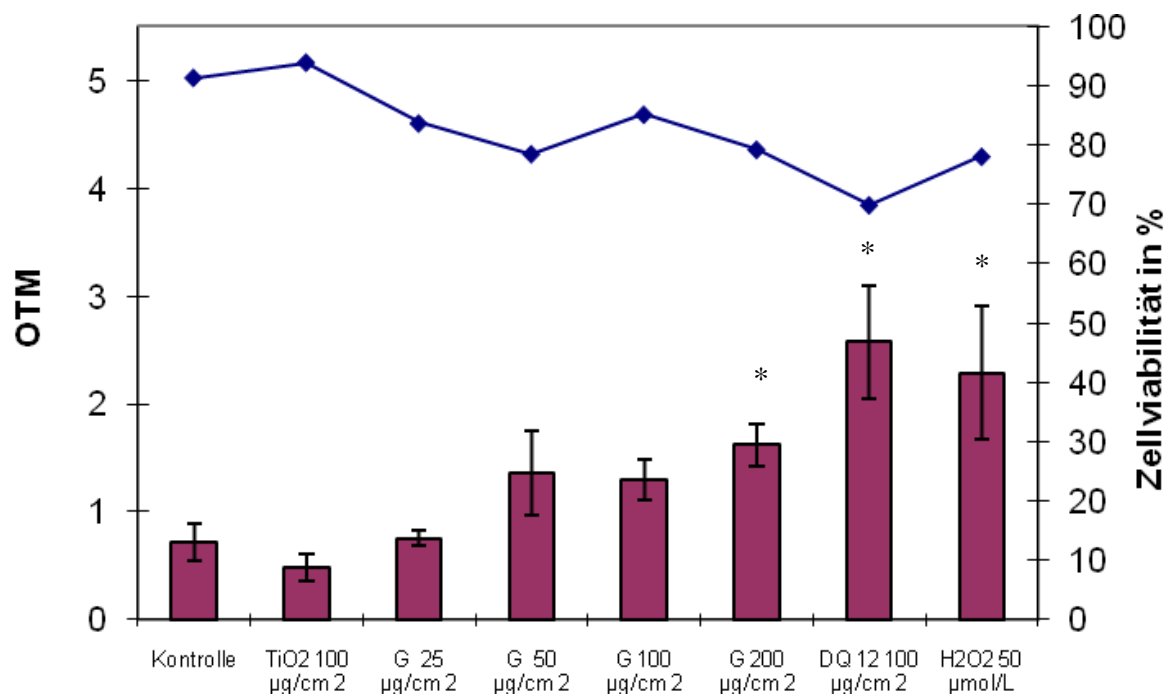


Abb. 14 Vitalität (Linien) und Kometen (Säulen) als OTM in Lungenepithelzellen A549 nach Exposition gegenüber der negativen Kontrolle TiO₂. Die Daten für den Comet-Assay sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) (* $p < 0,05$).

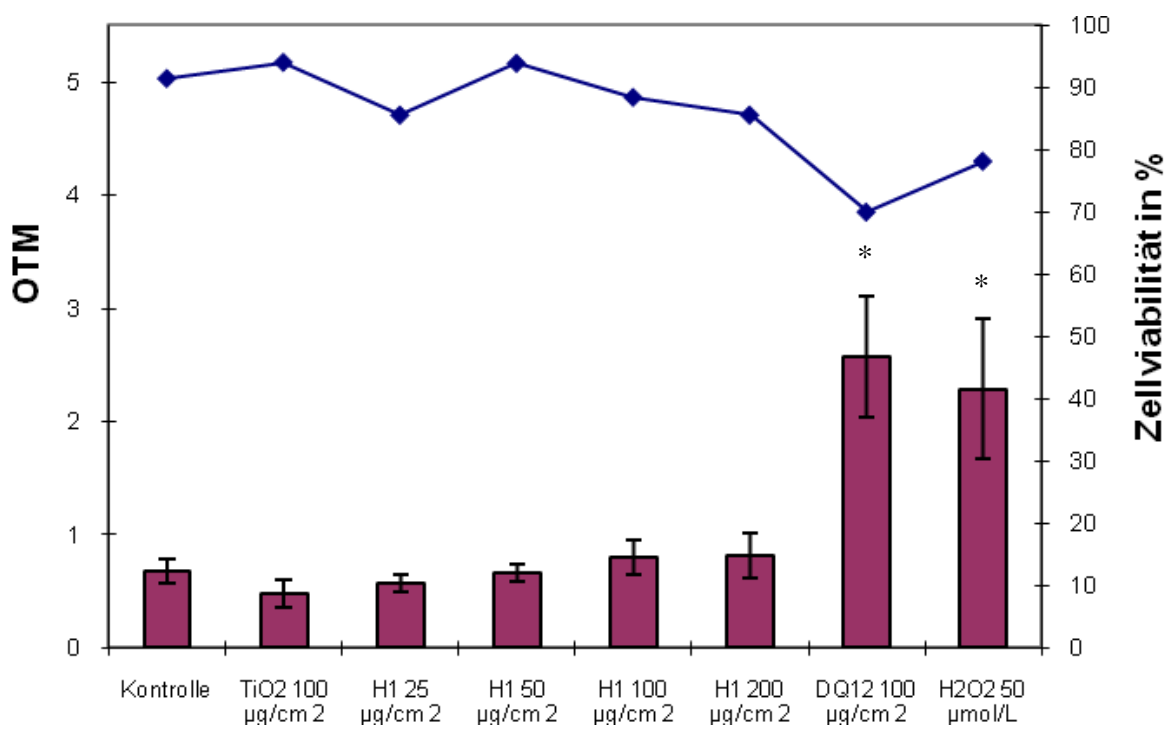
Zementstäube

Die Vitalität und DNA-Migration in A549-Zellen nach 4 stündiger Exposition mit den Zementstäuben G, H1, J, K, L sowie DQ12 sind in Abb.15 dargestellt. Bei den Zementstäuben H1, J, K, L zeigten sich für die Konzentrationen 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und bei der Partikelkontrolle Quarz DQ12 für die Konzentration 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aufgrund der Vitalität keine Anzeichen von Zytotoxizität. Insgesamt ist für die meisten untersuchten Zementstäube keine signifikante DNA-Migration bis zu der Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zu erkennen. Nur bei dem Zementstaub G zeigte sich in der höchsten (nicht zytotoxischen) Konzentration eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikante Erhöhung des OTM ($p = 0,0399$). (Abb.15)

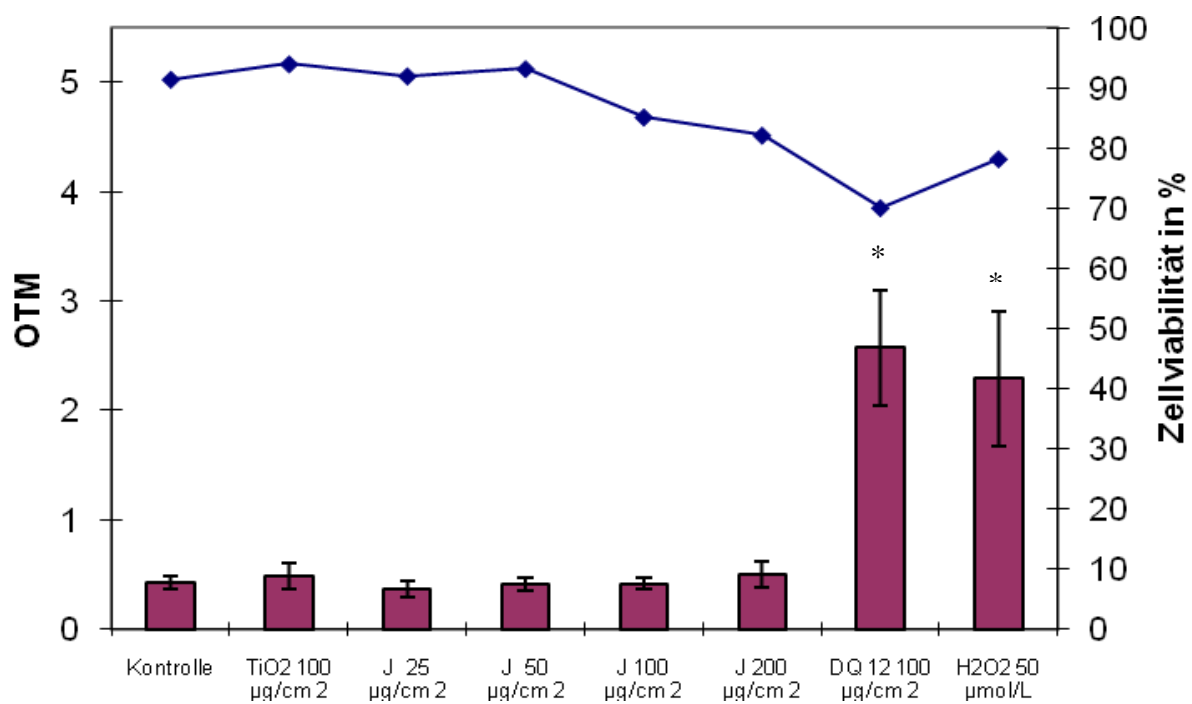
Zement G



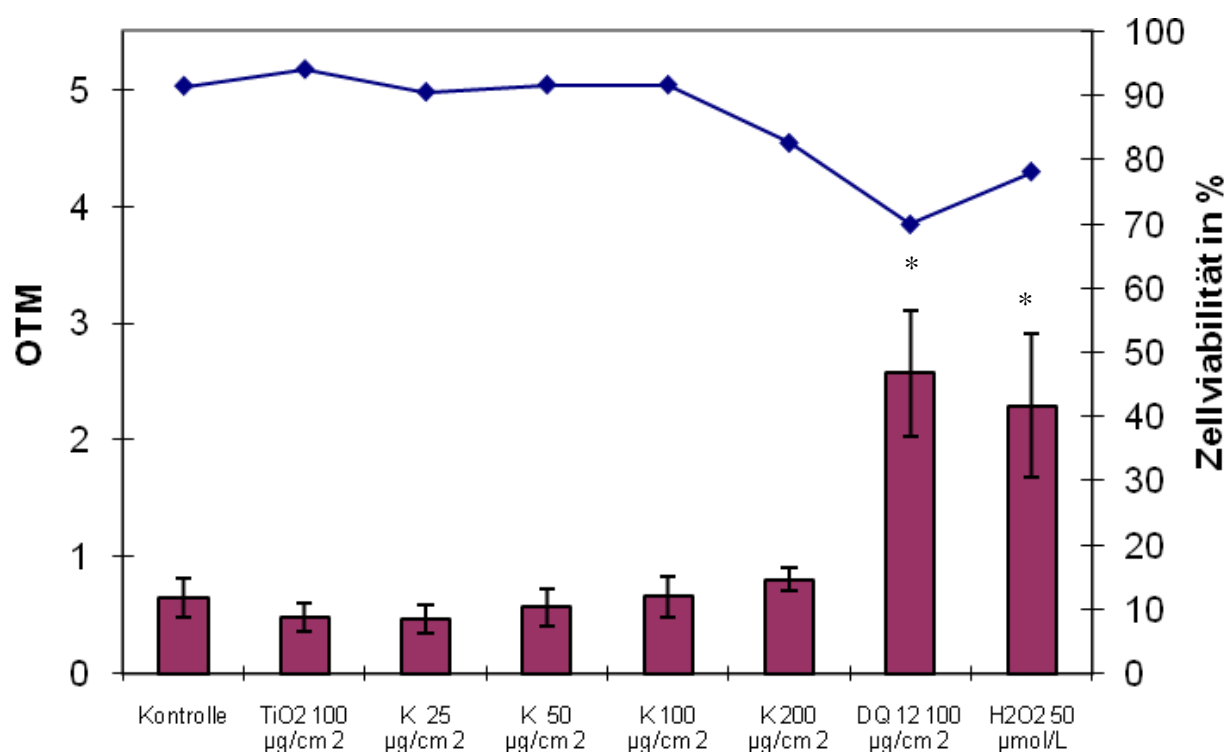
Zement H1



Zement J



Zement K



Zement L

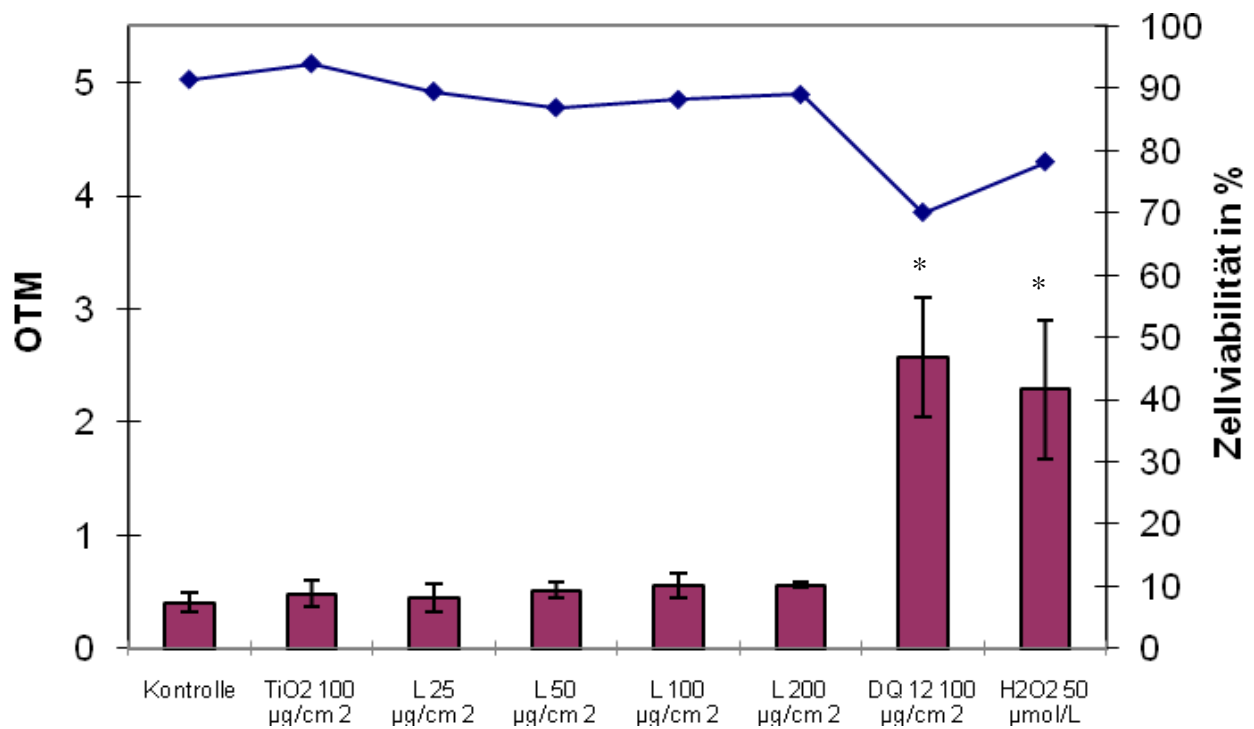


Abb. 15 Effekt von Zementstäuben auf Genotoxizität von Lungenepithelzellen A549 gemessen im Comet-Assay. Vitalität (Linien) und OTM (Säulen) in Lungenepithelzellen A549 nach Exposition gegenüber der Negativkontrolle TiO₂ und den Positivkontrollen Quarz DQ12 und Wasserstoffperoxid. Die Daten für den Comet-Assay sind Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) (*p < 0,05).

3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse (WST-1 und Comet-Assay) in A549-Zellen

Die in dieser Arbeit untersuchten Zemente H1, J, K, und L zeigten keine zytotoxische oder gentoxische Wirkung auf die Zelllinie A549. Lediglich beim Zement G wurden bei der höchsten getesteten Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ schwach positive Effekte im Comet-Assay beobachtet. In der Tabelle 5 sind alle Ergebnisse (WST-1, Zellvitalität und Comet-Assay) noch einmal zusammengefasst.

	WST-1	Zellvitalität (Erythrosin B)	Comet-Assay
Konzentrationen ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	25, 50, 100, 200	25, 50, 100, 200	25, 50, 100, 200
Partikel			
DQ12	+++	++	+++
TiO ₂	-	-	(+)
Zement G	-	-	(+)
Zement H1	-	-	-
Zement J	-	-	-
Zement K	-	-	-
Zement L	-	-	-

Tab. 5 Zusammenfassung der beobachteten Effekte von Zementstäuben und den entsprechenden Partikelkontrollen, einschließlich Zytotoxizität (WST-1, Comet-Assay). +, ++ und +++ drücken schwache, moderate und sehr starke Wirkung aus. - bedeutet, dass kein Effekt nachweisbar war.

4. Diskussion

Heutzutage stellen die feine und ultrafeine Partikel der schwerlöslichen Stäube ein großes Problem dar. Am meisten Aufmerksamkeit erregen die Stäube, die alveolär durchgängig sind, wie z.B. quarzhaltige Stäube. Diese finden die Anwendung aufgrund ihrer besonderen chemischen und physikalischen Eigenschaften besonders in der Bauindustrie in Form von Zementen. Dank zahlreichen Studien kann man zytotoxische und gentoxische Wirkung vom reinen Quarzstaub genau nachweisen (Schins et al., 2002). Allerdings ist die Wirkung vom Staub auf die lebendigen Zellen bisher nicht ausführlich erforscht.

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war, ein möglichst toxischen Potential (zytotoxische oder DNA-schädigende Wirkung) von Zementstäuben, die im europäischen Baugewerbe Anwendung finden, aufzudecken.

Zusammen mit anderen Kollegen wurden neun verschiedene Zementarten auf unterschiedliche toxische Wirkung in Lungenzellen A549 untersucht. Die Lunge ist primär exponiertes Organ, deshalb hat man die humanen Typ II Alveolar-Epithelzellen A549 für alle Tests für die Untersuchungen von den Zytotoxizität und Gentoxizität der Zementstäube ausgewählt. Als biologischer Endpunkt diente in den Studien zur Zytotoxizität der WST-1-Assay. Er misst die metabolische Zellaktivität und stellt eine wasserlösliche Variante des bisher bekannten MTT-Tests dar (Mosmann, 1983). Die Gentoxizität wurde mit Hilfe des Comet-Assay's gemessen und mit der Wirkung von Quarzstaub verglichen. Für die Validierung der angewandten Testsysteme wurden verschiedene Substanzen als negative und positive Kontrollen eingesetzt: Titandioxid (TiO_2) in einer Partikelgröße von 0,2 bis 0,5 μm als negative Kontrolle, weil es in dieser Größe bisher als inaktives Material bekannt ist; Feinquarz DQ12 (Dörentruper Quarz) als Partikelkontrolle sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als positive chemische Kontrolle. Alle Stäube wurden vom Verein Deutscher Zementwerke (VDZ) Düsseldorf Anfang 2006 angefertigt, kodiert und in Glasflaschen bereitgestellt.

4.1 Zusammenhänge zwischen den Zementpartikelgröße und Toxizität der Zementstäube.

Die Partikelgröße aller Stäube war immer kleiner als 10 µm. Die Zementstaub-Proben wurden mit einem Zick-Zack-Sichter sortiert, um einen mittleren Durchmesser zwischen 1 und 2,5 µm zu gewinnen und so möglichst lungengängige Fraktionen zu erhalten. Nur so konnte eine „worst-case-Situation“ abgeschätzt werden. Dabei wurden auch zu geringen Prozentsätzen (etwa 5%) Partikelgrößen <0,1 µm (ultrafein) erzeugt und in den Biotesten eingesetzt. Es wäre daher ein biologischer Effekt, basierend auf die Kleinheit der Partikel, zu erwarten gewesen, denn eine Studie von Totsuka et al. 2009 zeigte, dass für Nanopartikel (<100 nm), die in einer Vielzahl häufig genutzter Produkte vorkommen, prinzipiell mit einer gentoxischen Wirkung von sehr kleinen Partikel egal welcher Zusammensetzung zu rechnen ist.

Andere Studie zeigten, dass kleine Partikel, die eine Neigung zur Aggregatbildung haben, viel gefährlicher als größere Partikel sind, weil sie leichter phagozytiert werden können (Stearns et al., 2001).

Auch dadurch hervorgerufene Entzündungsreaktion kann DNA-Strangbrüche verursachen. Mehrere Studien (Jiminez, 2000; Shukla et al., 2000) haben nachgewiesen, dass im durch den Feinstaub gereizten Lungengewebe eine Zytokinausschüttung erfolgt und dadurch ein Einstrom von entzündlichen Phagozyten provoziert wird.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Zementstäuben mit geringem Anteil an den ultrafeinen Partikeln wurde jedoch keine gentoxische Wirkung gefunden. Mit Hilfe der Lichtmikroskopie konnte man auch keine Aufnahme von Zementstäuben in die A549-Zellen feststellen. Somit scheint die Aufnahme von Zementen in die Epithelzellen für die untersuchten Konzentrationen sehr gering zu sein bzw. ganz zu fehlen.

4.2 Einfluss der chemischen Zusammensetzung auf die Toxizität der Zementstäube

Die Ergebnisse des WST-1-Tests und Comet-Assay nach Exposition der A549-Zellen gegenüber den verschiedenen Zementstäuben zeigen, dass keine konzentrationsabhängige Zyto- bzw. Gentoxizität beobachtet wurden. Die Zementstäube haben also im experimentellen Ansatz keinen Einfluss auf die Viabilität der Lungenzellen. Aus den Ergebnissen der chemischen Analyse der wichtigsten Komponenten (z.B. SiO_2) und Spurenelementen (z.B. As, Cu, Fe, V, Cr) in den ungesiebten und gesiebten Proben, hat man erwartet, dass mindestens geringe biologische Wirkungen ausgelöst werden sollten. Besonders toxische Effekte wären bei dem relativ stark SiO_2 -haltigen Zementstaub G zu erwarten, denn verschiedene Studien haben bereits einen Zusammenhang von Lungenkrebs und chronischer Exposition von kristallinem Siliziumdioxid (SiO_2) gefunden (Woitowitz In: Valentin et al., 1985). Trotz des relativ hohen Gehalts an SiO_2 im Zementstaub G, konnte man nur bei den höchsten Konzentrationen einen geringen toxischen Effekt beobachten, der signifikant ist.

4.3 Zusammenhänge zwischen den geprüften Konzentrationen und toxischen Eigenschaften der Zementstäube

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Konzentrationsreihen gewählt: 25 µg/cm², 50 µg/cm², 100 µg/cm² und 200 µg/cm².

Da der Versuch *in vitro* stattgefunden hat, war die Zelllinie A549 viel extremeren Bedingungen ausgesetzt, als die Lungenzellen tatsächlich bei Menschen *in vivo*. In der vorliegenden Dissertation waren die Zellen pro Fläche in cm² dichter eingesät, als man in einem menschlichen Lungengewebe nach einer Exposition erwarten würde. Die Zementstaubkonzentrationen, die im Versuch auf die Zelllinie A549 aufgetragen waren, waren viel höher als die, denen die Lungenzellen in Wirklichkeit ausgesetzt sind. Außerdem sind *in vitro* Versuch sämtliche Schutzmechanismen des respiratorischen Trakts nicht vorhanden, wie z.B. die Zilien der Bronchialzellen oder Alveolarmakrophagen.

Somit entsprachen die Bedingungen des *in vitro* Versuches einer Überlastung in Folge hoher Staubkonzentrationen. In solchen Fällen ist in der Literatur eine potenzielle Begünstigung von der Entwicklung von chronischen Atemwegerkrankungen beschrieben (Maciejewska & Bielichowska-Cybula, 1991).

In der vorliegenden Arbeit konnte man selbst bei diesen hohen Konzentrationen keine gentoxischen oder zytotoxischen Effekte in der Zelllinie A549 feststellen.

4.4 Alkalität

Die meisten Zementstäube weisen in Suspension sehr hohe pH-Werte auf (ab 13 und mehr). Durch die Freisetzung der alkalischen Komponenten der einzelnen Zementstäube besteht bei einer kontinuierlichen Zement-Exposition eine lokale Auswirkung auf den pH-Wert und den epithelialen Schichten der Schleimhaut. Das kann zur akuten Entzündungen der Schleimhaut oder chronisch sogar zur DNA-Schaden führen.

Die in wässriger Suspension stark alkalisch wirkenden Zemente, wurden durch das verwendete Kulturmedium teilweise abgepuffert. Man hat versucht das Eiweiß aus dem Kulturmedium möglichst komplett zu entfernen, um das Sinken des pH-Wertes zu verhindern. Andererseits hätte eine zu starke Alkalose im Testsystem sicher recht schnell zu der Zytotoxizität und den verfälschten Messwerten geführt.

Außerdem wurden Zemente nicht als reiner Staub, sondern als eine Lösung auf die Lungenzellen aufgebracht. Bei der Aufnahme von Partikel in der Lungen *in vivo* kann allein durch den mechanischen Reiz eine basische Reaktion mit pH-Abfall ausgelöst werden, was im respiratorischen System Irritation der mukotischen Schicht verursachen kann, wie z.B. bei Tabak oder PAH (Fair, 2005; Dietz et al., 2004).

Letztendlich konnte man kein exaktes Abbild der Expositionssituation in den Bronchien und Alveolen schaffen. Somit ist eine Schädigung der Zellen unter den alkalischen Bedingungen *in vivo* sicherlich eher anzunehmen, als im für diese Arbeit verwendeten Biotestsystemen.

5. Zusammenfassung

Die Konzentrations-Wirkungseffekte von Europäischen Zementstäuben wurden gleichzeitig in zwei Testsystemen (WST-1-Assay und Comet-Assay) untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die verwendeten A549-Zellen auf die Stäube wie Feinquarz DQ12 empfindlich reagieren und daher prinzipiell für die Feinstaubuntersuchungen geeignet sind. Mit den beiden Testsystemen wurden die Endpunkte der Zytotoxizität und Gentoxizität erfasst.

Comet-Assay lieferte bei der Zement-Untersuchung gute Ergebnisse. Durch die einfache und schnelle Handhabung, hohe Sensitivität (reicht schon geringe Zellenzahl), geringen Kosten und genauen Ausmaß und Art der DNA-Brüchen ist diese Methode für die Untersuchungen der verschiedenen Arten von Stäuben sehr gut geeignet.

Die Gentoxizität der Kontrollen und der fünf Stäube wurde mit dem Comet-Assay untersucht. Wasserstoffperoxid und der Kontrollstaub Quarz DQ12 zeigten relevante gentoxische Effekte in den A549-Zellen. Die DNA-schädigende Wirkung von Quarz DQ12 wurde bereits bei einer Konzentration von $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ festgestellt. Dagegen wirken Titandioxid (negative Staubkontrolle) und alle weiteren geprüften Stäube nicht gentoxisch.

Lediglich bewirkte der Zementstaub G in der höchsten (nicht zytotoxischen) Konzentration eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Erhöhung des Olive Tail Moments (OTM).

Nicht im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die Zementstäube auf gentoxische Wirkungen mit Hilfe des Mikronukleus-Tests untersucht (Vojnar & Stecher, 2007). Der Test zeigte, dass die untersuchten Zementproben auch beim Mikrokern-Test keine gentoxischen Wirkungen auf die Lungenzellen A549 haben.

Obwohl die in dieser Arbeit getesteten Zementstäube kein zytotoxisches oder gentoxisches Potential in menschlichen Lungenzellen haben, schließt es jedoch nicht aus, dass gentoxische bzw. mutagene Wirkungen im Lungengewebe bzw. sogar in dem sehr komplexen System des menschlichen Atemtraktes oder in den anderen Zelltypen, auftreten können. Solches kann letztlich nur durch *in-vivo*-Studien und/oder epidemiologischen Studien mit hinreichender Sicherheit geklärt werden. Weiterhin existieren auch noch methodische Probleme, wie z.B. die Pufferung der Zementalkalität durch das verwendete Kulturmedium. Somit lassen die bisherigen Ergebnisse noch

keine direkte Interpretation der gesundheitlichen Relevanz für den menschlichen Organismus zu.

Summary

Dusts concentration – influence effects have been studied simultaneously in two test systems: WST-1-Assay and Comet-Assay. Previous results have shown that A549-cells sensibly react to such dusts as fine quartz DQ12 and therefore are in principle suitable for dust studies. The end points of cytotoxicity and genotoxicity have been summarized in to both test systems mentioned above.

The Comet-Assay has provided good results for a cement studies. This method is qualified for the study of various types of dusts due to the simplicity and quickness of implementation, high sensitivity (small amount of cells are enough), low price and exact scale and types of DNA-fractures.

The genotoxicity of the controlling and the five dusts have been studied with the Comet-Assay. A hydrogen peroxide and the pilot dust DQ12 quartz have shown relevant genotoxic effect in the A549-cells. A DNA-damaging influence of DQ 12 quartz has already been detected at a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. At the contrary a titanium dioxide (negative dust controls) and the further examined dusts have no genotoxic influence.

Exceptionally the cement dust G in the highest (not cytotoxic) concentration causes a significant in comparison with solvent control increasing of an Olive Tail Moment.

Above that with a help of a micronucleus-test the cement dusts have been studied for a genotoxic influence by another colleague. The test revealed that the examined (researched) cement samples by a micronucleus-test cause no genotoxic influence on the lung cells A 549 either.

The cement dusts, which have been tested in this paper, have no cytotoxic or genotoxic potential in human lung cells. Though, it doesn't mean that genotoxic or mutagenic activity can't appear in another type of cells or cell lines or even in a very complicated system of human respiratory airways.

At least this can only be determined with enough certainty through an *in-vivo*-study and/or epidemiological studies. Furthermore, there are some methodological problems, for example, buffering of a cement alkalinity by means of applicable culture environment. Hereby the main results of this study do not allow yet any direct interpretation of the human health relevance.

Literaturverzeichnis:

Abrons, H.L., Petersen, M.R., Sanderson, W.T., Engelberg, A.L., Harber, P.

Symptoms, ventilatory function, and environmental exposures in Portland cement workers

Br J Ind Med 1988, 45: 368 - 375

Anard D., Kirsch-Volders M., Elhajouji A., Belpaeme K. and Lison J.D.

In vitro genotoxic effects of hard metal particles assessed by alkaline single cell gel and elution assays

Carcinogenesis 1997, 18: 177 - 184

Anderson D. and Plewa M.J.

The international comet assay workshop

Mutagenesis 1998, 13: 67 - 73

Ashby J., Tinwell H., Lefevre P.A. and Browne M.A.

The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay) measurement of tail length and moment

Mutagenesis 1995, 10: 85 - 90

Bazas T.

Effects of occupational exposure to dust on the respiratory system of cement workers

J Soc Occup Med 1980, 30: 31 - 36

Beckers J., Behrendt H. Cyrys J., et al.

Aerosolforschung in der GFS, Großes Netzwerk für kleine Teilchen

2005, 9 - 29.

Bepler G., Koehler A., Kiefer P., Havemann K., Beisenherz K., Jaques G., Gropp C., Haeder M.

Characterization of the state of differentiation of six newly established human non-small-cell lung cancer cell lines

1988, 37: 158 – 171

Bielichowska-Cybula G., Maciejewska A.

Biological effects of cement dust

Med Pr 1991, 42: 281 - 289

Cauvin J.M., Guenel P., Luce D., Brugere J., Leclerc A.

Occupational exposure head and neck carcinoma

Clin Otolaryngol 1990, 15: 439 - 45

Collins A.R., Dobson V.L., Dusinska M., Kennedy G., Stetina R.

The comet assay: what can it really tell us?

Mut Res 1997, 375:183 - 193

Collins A.R., Dusinska M., Franklin M., Somorovska I., Petrovskajf, Duthie S., Panayiotidis M., Raslova K. and Vaughan N.

Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications

Environ, Mol Mutagen 1997, 30: 139 - 146

Cortez P.J., Peixoto M.A.

Pulmonary and hepatic granulomatous disorders due to the inhalation of cement and mica dusts

Thorax 1978, 33: 219

Costa M., Salnikow K., Sutherland J.E., Broday L., Peng W., Zhang Q., Kluz T.

The role of oxidative stress in nickel and chromate genotoxicity

Mol Cell Biochem 2002, 234 - 235

Dietz A., Sennewald E., Maier H.

Indoor air pollution by emissions of fossil fuel-single stoves-possibly a hitherto underrated risk factor in the development of carcinomas in head and neck

Otolaryngology – Head and Neck surgery 1995, 2: 308 - 315

Dietz, A., Ramroth, H., Urban, T., Ahrens, W., Becher, H.

Exposure to cement dust, related occupational groups and laryngeal cancer risk: results of a population based case-control study

Int J Cancer 2004, 108: 907 - 911

Einbrodt H., Oberthür W., Hentschel D.

Über den Staubanfall in Zementwerken und deren Umgebung im Hinblick auf mögliche Gesundheitsschäden

Arbeitsmedizin, Sozialmedizin, Arbeitshygiene 1966, 10: 349

Fairbairn D.W., Olive J.L., O'Neill K.L.

The comet assay: a comprehensive review

Mutat. Res. 1995, 339: 37 - 59

Fairhurst S., Phillips A., Gilles C., Brown

Portland cement dust: criteria document for an occupational exposure limit

1997 J Occup Env Med 47

Flanders D., Rothman K.J.

Occupational risk for laryngeal cancer

AM J Public Health 1982, 72: 369 - 72

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, et al.

In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors

J Natl Cancer Inst 1973, 51: 1417 - 1423.

Gluck U., Gebbers J.O., Sutherland B.M., Woodhead A.D.

The comet assay of nasal epithelia: measurement of DNA damage for the assessment of genotoxic air pollution

Laryngoscope 2000, 110: 123 – 125

Hartwig A.

Role of DNA repair in particle- and fiber-induced lung injury

Inhal Toxicol 2002, 14: 91 - 100

Fell A.K., Thomassen T.R., Kristensen P., Egeland T., Kongerud J.

Respiratory symptoms and ventilatory function in workers exposed to portland cement dust

J Occup Environ Med 2003, 45: 1008 - 1014

Hart G.A., Hesterberg T.W.

In vitro toxicity of respirable-size particles of diatomaceous earth and crystalline silica compared with asbestos and titanium dioxide

J Occup Environ Med 1998, 40(1): 29 - 42

Jöckel K.H., Brüske-Hohlfeld I.

Lungenkrebsrisiko durch berufliche Exposition

Ecomed 1998, Landsberg

Kalacic I.

Early detection of expiratory airflow obstruction in cement workers

Arch Environ Health 1974, 29: 147 - 149

Kassie F., Parzefall W. and Knassmüller S.

Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies.

Mutat. Res. 2000, 463: 13 - 31

Knaapen A.M., Borm P.J.A., Albrecht C., Schins R.P.F.

Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanism

Int. J. Cancer Mini Review 2004, 109: 799 - 809

Lee J.G., Madden J.V.I.C., Reed W., Adler K., Devhn R.

The use of the single cell gel electrophoresis assay in detecting DNA single strand breaks in lung cells in vitro

Toxicol. Appl. Pharmacol. 1996, 141: 195 - 204

Lieber M., Smith B., Szakal A., Nelson-Rees W., Todaro G.

A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells

Int J Cancer 1976, 17: 62 – 70

Lindl, T.

Zell- und Gewebekultur

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

2002

Maier H., Sennewald E., Dietz A., Fischer G., Gewelke R., Heller W.D., Kura N.,
Zöller J.

**Risikofaktoren für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich – Ergebnisse
der Heidelberger Fallkontrollstudien**

1994

Moller P., Knudsen L.E., Loft S., Wallin H.

**The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-
damaging agents and effect of confounding factors**

Cancer Epidemiology Biomarkers Prev. 2000, 9: 1005 - 1015

Mosmann T.

**Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to
Proliferation and Cytotoxicity Assays**

Journal of Immunological Methods 1983, 65: 55 - 63

Mwaiselage J., Bratveit M., Moen B., Mashalla Y.

**Cement dust exposure and ventilatory function impairment: an exposure-
response study**

J Occup Environ med 2004, 46: 658 - 667

Nadr M. Jomha, Janet A.W. Elliott, Garson K. Law, Locksley E. Mc Gann

**Evaluation of chondrocyte survival in situ using WST-1 and membrane integrity
stains**

Cell and Tissue Banking 2007, 8: 179 - 186

Obenland H., Kerber T.

**Literaturstudie zu Vorkommen und gesundheitlicher Bedeutung von
Feinstaub in Innenräumen**

2005, 2 - 3

Rajaei-Behbahani N., Schmezer P., Ramroth H., Burkle A., Bartsch H., Dietz A., Becher H.

Reduced poly (ADP-ribosyl)ation in lymphocytes of laryngeal cancer patients: Results of a case-control study

Int J of Cancer 2002, 98: 780 - 784

Rojas E., Lopes M.S., Valverde M.

Single cell electrophoresis assay: methodology and applications

J Chromatogr B Biomed 1999, 722: 225 - 254

Roche Diagnostics

Cell Proliferation Reagent WST-1

Anleitung 1999, Roche

Schins R.P.F., Knaapen Ad M., Cakmak G.D., Shi T., Weishaupt C., Borm P.J.A.

Oxidant-induced DNA damage by quartz in alveolar epithelial cells

Mutation Research 2002, 517: 77 - 86

Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E.L.

A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells

Exp Cell Res, 1988, 175: 184 - 191

Stearns R.C., Paulauskis J.D., Godleski J.J.

Endocytosis of Ultrafine Particles by A549 Cells

Am J Respir Cell Mol Biol 2001, 24: 108 - 115

Shukla A., Timblin C., Berube K., Gordon T., McKinney W., Driscoll K., Vacek P., Mossman B.T.

Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF-kappaB-related genes and oxidant-dependent NF-kappaB activation in vitro

Am J Respir Cell Mol Biol 2000, 23: 182 - 187

Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rofas E., Ryu J.-C., Sasaki Y.F.

Single cell gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing

Environmental and Molecular Mutagenesis 2000, 35: 206 - 221

Tjelle T.E., Lovdal T., Berg T.

Phagosome dynamics and function

Bio Essays 2000, 22: 255 - 263

Totsuka Y, Higuchi T, Imai T, Nishikawa A, Nohmi T, Kato T, Masuda S, Kinae N, Hiyoshi K, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Ichinose T, Fukumori N, Watanabe M, Sugimura T, Wakabayashi K.

Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems. Part Fibre Toxicol.

2009, 6: 23

Woitowitz, H.-J. In: Valentin, H.

Die gesetzlichen Berufskrankheiten, Erkrankungen der Atemwege. In: Arbeitsmedizin, Band 2. Berufskrankheiten

Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1985: 184 - 228

Wolz L., Krause G., Scherer G., Aufderheide M., Mohr U.

In vitro genotoxicity assay of sidestream smoke using a human bronchial epithelial cell line

Food and chemical toxicology 2002 40: 845 – 850

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Die vorliegende Doktorarbeit entstand am Institut für Innenraum- und Umwelttoxikologie Gießen. Dem Direktor des Instituts, Herrn Prof. Dr. Volker Mersch-Sundermann, danke ich herzlich für die freundliche Unterstützung.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. Gminski bedanken für die freundliche und engagierte Betreuung.

Außerdem möchte ich meinem Ehemann für seine Hilfe und Unterstützung danken.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5970-5



9 783835 195970 5